

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Der Einfluss des experimentellen
Thrombolytikums Mikroplasmin
auf das neuronale und
mikrovaskuläre System nach
transienter fokaler zerebraler
Ischämie

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

vorgelegt von
Marion Schubert
aus Ulm

2009

Mit der Genehmigung der Medizinisch Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	<u>Prof. Dr. med. G. F. Hamann</u>
Mitberichterstatter:	<u>Priv. Doz. Dr. Sefan Zausinger</u> <u>Prof. Dr. Roman Haberl</u>
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	<u>Dr. rer. nat. Dorothe Burggraf</u>
Dekan:	<u>Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR</u>
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>12.11.2009</u>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Definition und Epidemiologie des Schlaganfalls.....	1
1.2. Therapie des Schlaganfalls.....	1
1.3. Die zerebrale Ischämie.....	2
1.4. Das mikrovaskuläre System.....	3
1.5. Das Gerinnungssystem.....	6
1.6. Die Matrixmetallo-Proteinase (MMP).....	8
1.7. Die Thrombolyse.....	9
1.7.1. Plasmin als Thrombolytikum.....	10
1.7.2. Mikroplasmin.....	10
1.7.3. Die Plasminogenaktivatoren (PA).....	11
1.7.3.1. t-PA.....	11
1.7.3.2. u-PA.....	12
1.7.4. Der Vergleich von Mikroplasmin und rt-PA.....	13
2. Fragestellungen	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Das Fadenmodell.....	15
3.1.2. Der Versuchsaufbau.....	15
3.1.2.1. Das middle cerebral artery occlusion (MCAO)-Modell.....	15
3.1.2.2. Die Messverfahren.....	17
3.1.2.2.1. Die Vitalparameter.....	17
3.1.2.2.3. Die Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF).....	18
3.1.2.2.3. Die Applikation von Mikroplasmin.....	19
3.3. Die experimentellen Gruppen.....	19
3.4. Die Verhaltensstudien.....	20
3.4.1. Der Garcia Test.....	20
3.4.2. Der Licking Test.....	20
3.5. Die immunhistochemischen Verfahren.....	21
3.5.1. Die Nissl Färbung.....	21
3.5.1.1. Die Infarktgrößenbestimmung (Volumetrie).....	22
3.5.2. Immunhistochemie für Kollagen Typ IV.....	22
3.5.2.1. Videoimagingauswertung der Kollagen Typ IV Schnitte.....	23
3.6. Die biochemische Aufarbeitung.....	24
3.6.1. Der Western Blot.....	25
3.6.2. Der Kollagen IV Western Blot.....	25
3.6.3. Der Hämoglobin Western Blot.....	25
3.6.4. Die Zymographien.....	25
3.6.4.1. Die Gelatine Zymographie.....	26
3.6.4.2. Die reverse Zymographie.....	26
3.6.4.3. Die caseinabhängige Plasminogen Zymographie.....	26
3.6.5. Die Proteinbestimmung für Zymographie und Western Blot.....	26
3.6.6. Die Auswertung der biochemischen Daten.....	26
3.7. Statistische Methoden.....	27
3.8. Die Tierschutzgenehmigung.....	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Die Verhaltensstudien.....	28
4.1.1. Der Garcia Test.....	28
4.1.2. Der Licking Test.....	29
4.2. Das Infarktvolumen.....	30

Inhaltsverzeichnis

4.3.	Die Gefäßzahl und die Gefäßdichte	32
4.4.	Das Kollagen Typ IV	34
4.5.	Die Hämoglobin Extravasation	35
4.6.	Das MMP-2 und MMP-9.....	37
4.7.	Die endogenen Inhibitoren TIMP-2 und TIMP-1	39
4.8.	Das Verhältnis Inhibitor zu Protease TIMP-2/MMP-2 und TIMP-1/MMP-9 ...	41
4.9.	Die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA.....	43
5.	Diskussion	46
5.1.	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	46
5.2.	Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Verhaltenstests	47
5.3.	Der Einfluss von Mikroplasmin auf das Infarktvolume	48
5.4.	Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Morphologie und Integrität der mikrovaskulären Basallamina	49
5.5.	Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Matrixmetallo-Proteinasen mit ihren Inhibitoren TIMP	50
5.6.	Der Einfluss von Mikroplasmin auf das Plasminogen-Plasmin-System und die endogenen Plasminogenaktivatoren	52
5.7.	Die methodischen und konzeptionellen Limitationen der Arbeit	53
5.8.	Der Vergleich von Fadenmodell und thrombo-embolischem Modell.....	54
5.9.	Die Schlussfolgerungen und weitere Ausblicke.....	55
6.	Zusammenfassung.....	57
7.	Literaturverzeichnis.....	59
8.	Anhang.....	71
8.1.	Die Masterprotokolle	71
8.1.1.	Das Nissl Färbeprotokoll.....	71
8.1.2.	Das Kollagen Peroxidase Protokoll.....	72
8.1.3.	Die Übersicht über die biochemischen Protokolle	74
8.1.4.	Die Aufarbeitung der Proben für die Biochemie	74
8.1.5.	Das Western Blot Protokoll	75
8.1.6.	Das Zymographien Protokoll.....	76
8.2.	Die Tabellen aus dem Ergebnisteil.....	76
8.2.1.	Tabelle 3, Licking Test.....	76
8.2.2.	Tabelle 4, Infarkt volumetrie.....	77
8.2.3.	Tabelle 6, Kollagen IV Western Blot.....	77
8.2.4.	Tabelle 7, Hämoglobin Extravasation.....	78
8.2.5.	Tabellen 8A+B, MMP-2 und MMP-9	79
8.2.6.	Tabellen 9A+B, TIMP-2 und TIMP-1	80
8.2.7.	Tabellen 10A+B, TIMP-2/MMP-2 und TIMP-1/MMP-9	81
8.2.8.	Tabellen 11A+B, t-PA und u-PA.....	82
9.	Danksagung.....	83
10.	Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

A		N	
A.	Arteria	N.	Nervus
AK	Antikörper	n	Anzahl
Aqua dest.	destilliertes Wasser	nm	Nanometer
		n.s.	nicht signifikant
B		O	
BG	Basalganglien	OP	Operation
BHS	Blut-Hirn-Schranke		
BL	Basallamina		
BM	Basalmembran		
BSA	bovine serum albumin		
bzw.	beziehungsweise		
C		P	
ca.	circa	PA	Plasminogenaktivator
cm	Zentimeter	PBS	phosphate buffered saline
°C	Grad Celsius	PMN Leukozyt	polymorphkerniger Leukozyt
D		R	
d.h.	das heißt	ROI	regions of interest
		RT	Raumtemperatur
		rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator
E		S	
EZM	extrazelluläre Matrix	sog.	sogenannte
		s	Sekunde
G		T	
g	Gramm	TBST	Tris-buffered saline Tween
		TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
H		TNF	Tumornekrosefaktor
h	Stunde	t-PA	tissue plasminogen activator
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		
I		U	
ICB	intrazerebrale Blutung	u-PA	urokinase-type plasminogen activator
K		V	
kDa	Kilodalton	v.a.	vor allem
kg	Kilogramm		
KG	Körpergewicht		
Kx	Kortex		
L		Z	
l	Liter	Z.n.	Zustand nach
LDF	Laser-Doppler-Blutflussmethode		
M			
MCAO	middle cerebral artery occlusion		
µm	Mikrometer		
µPli	Mikroplasmin		
MMP	Matrixmetallo-Proteinase		
mg	Milligramm		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		
max.	maximal		
mV	Mikrovolt		

1. Einleitung

1.1. Definition und Epidemiologie des Schlaganfalls

Als Schlaganfall bezeichnet man ein fokales, neurologisches Defizit, das Ausdruck einer akuten Minderperfusion des Gehirns (zerebrale Ischämie) (70-80%) ist oder durch eine intrazerebrale Blutung (10-20%) ausgelöst werden kann.

Der Schlaganfall zählt zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und belegt Platz drei der Todesursachen in Deutschland, hinter dem Herzinfarkt und den neoplastischen Neubildungen. Sowohl die Akutbehandlung von Schlaganfallpatienten, als auch deren Langzeitfolgebehandlungen belasten das Gesundheitswesen durch immense Kosten. Darüber hinaus verschlechtert sich die Lebensqualität der betroffenen Patienten oft erheblich.

In Deutschland treten jährlich bis zu 200.000 Schlaganfälle auf. Dabei ist die Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls stark altersabhängig und schwankt in den internationalen Studien zwischen 30 pro 100.000 Einwohner im 3.-4. Lebensjahrzehnt und bis 3.000/100.000 in der Altersgruppe der über 85-jährigen (Hartmann et al., 2001). Die Lebenszeitprävalenz liegt bei circa 15%, wobei Männer etwa 1,3-fach häufiger betroffen sind als Frauen. Die Letalität nach drei Monaten liegt bei durchschnittlich 20%, hierbei ist die Letalitätsrate von der Schlaganfallursache abhängig. Die Letalität bei Patienten mit ischämischem Insult beträgt nur ein Drittel der Letalitätsrate bei Patienten mit intrazerebralen Blutungen.

Insgesamt ist die Zahl der Neuerkrankungen an Schlaganfällen in Deutschland stabil, bzw. leicht rückläufig. Verantwortlich dafür sind vermutlich ein höheres Gesundheitsbewusstsein einerseits, sowie vor allem neue wissenschaftliche Forschungserkenntnisse, die verbesserte Behandlungsoptionen sowohl in der Akuttherapie als auch in der Primär- und Sekundärprävention ermöglichen. Dennoch wird, v.a. durch die zunehmende Überalterung der Bevölkerung, für die nächsten Jahren ein deutlicher Anstieg der Schlaganfallraten prognostiziert.

1.2. Therapie des Schlaganfalls

Einen ersten Schlaganfall überleben ca. 80-85% der Patienten in der Akutphase (Grau et al., 2001; Wolf et al., 1993). Das sofortige Einleiten der Basistherapiemaßnahmen, vorzugsweise durch stationäre Einweisung auf sogenannte Stroke Units, ist für den Schlaganfallpatienten lebensrettend. Primäres Ziel der klinischen Akuttherapie ist die Reperfusion des betroffenen Hirnareals (Molina et al., 2005), um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gehirns zu gewährleisten und um die fortschreitende Schädigung von Hirngewebe zu stoppen.

Die einzige, evidenz-basierte medikamentöse Therapieoption ist derzeit die systemische Lyse mit intravenöser Gabe des rekombinanten tissue-Plasminogenaktivators (rt-PA, Alteplase). Die Nachteile der Lysetherapie mit rt-PA sind gravierend und werden unter Kapitel 1.7.3.1 erläutert.

Es werden dringend neue anti-thrombotische Substanzen benötigt, die ein besseres Nutzen-/Risikoverhältnis aufweisen, um effizient die Rekanalisation und somit den Therapieerfolg zu sichern. Gleichzeitig sollten diese ein möglichst niedriges Nebenwirkungspotential, sprich Blutungen, aufweisen, um letztlich die Lebensqualität der Schlaganfallpatienten zu verbessern.

1.3. Die zerebrale Ischämie

Unter zerebraler Ischämie versteht man die Unterbrechung oder Verminderung der Sauerstoffversorgung des Gehirns. Man unterscheidet die globale zerebrale Ischämie von der fokalen zerebralen Ischämie, bei der nur umschriebene Gefäßterritorien betroffen sind.

Die fokale zerebrale Ischämie führt zu Schädigungen im Hirngewebe, denen eine Reihe pathophysiologischer Prozesse zugrunde liegen. Hierbei ist die Anzahl der irreversibel geschädigten Neuronen letztlich bestimmend für das Ausmaß des neurologischen Defizits. Aber auch weitere Gewebsbestandteile, wie Gliazellen und Mirkogefäße sind für das neurologische Outcome entscheidend. So konnte Hamann et al. (1999) zeigen, dass v.a. die zerebralen Mirkogefäße eine wichtige Rolle spielen. In weiteren experimentellen Untersuchungen konnte festgesellt werden, dass die zerebralen Mirkogefäße nach zerebraler Ischämie umgehend mit vielfältigen Umstrukturierungen und dynamischen Prozessen auf die neue Situation reagieren (del Zoppo et al., 1991). So kommt es zunächst zu metabolischen und morphologischen Veränderungen der neuronalen Zellen, v.a. in Form von Entzündungsreaktionen, Exzitotoxizität und Apoptose (Dirnagl et al. 1999; Dietrich et al., 1998). Gleichzeitig führt der vaskuläre Permeabilitätsverlust (Pulsinelli et al., 1992) zu Ödembildungen und petechialen Einblutungen. Zudem kommt es durch den Verlust der mikrovaskulären Integrität zu weiteren hämorrhagische Transformationen und Permeabilitätseinbußen (Pessin et al., 1991) mit Ödembildung (Hamann et al., 1995 und 2002). Die Integritätsminderung der Gefäßwand wiederum begünstigt die weitere Entwicklung petechialer Blutungen (Hamann et al., 1999). Im Westentlichen können drei proteolytische Mechanismen (siehe Kapitel 1.4) zum Abbau der Basallamina und damit zum Verlust der mikrovaskulären Integrität beitragen (Hamann et al., 1995, 1999 und 2002).

1.4. Das mikrovaskuläre System

Zerebrale Mikrogefäße sind definitionsgemäß Kapillaren, Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser $< 100 \mu\text{m}$ (del Zoppo et al., 2003). Die Hauptkomponenten der Mikrogefäße sind die Endothelzellen, die Basalmembran und verschiedene Zelltypen, wie Perizyten, Astrozyten und perivaskuläre Makrophagen (siehe Abbildung 1).

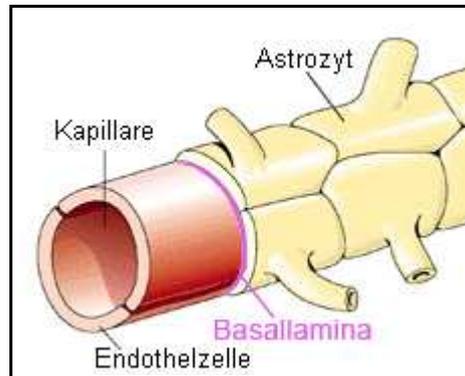


Abbildung 1: Darstellung eines Mikrogefäßes (modifiziert nach ¹³).

Die vaskuläre Integrität ist durch drei physiologische Barrieren gesichert, die den Übertritt von Blutbestandteilen ($> 20 \text{ kDa}$) in das Hirngewebe limitieren: (1) die Blut-Hirn-Schranke (BHS), (2) die Basallamina (BL) und (3) die Astrozyten.

(1) Die Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (BHS) hängen von ihrem charakteristischen Aufbau ab.

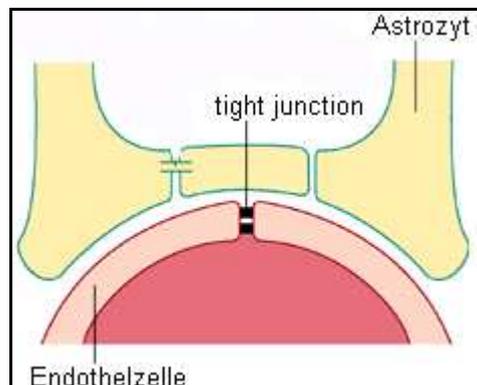


Abbildung 2: Darstellung der Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke und der Astrozyten (modifiziert nach ¹³).

Das morphologische Korrelat der BHS stellen die sogenannten Endothelzellen, die über inter-endotheliale Verknüpfungen (tight junctions) fest miteinander vernetzt sind (Risau et al., 1998), dar. Sie bilden eine nicht-fenestrierte, kontinuierliche Zellschicht, die den Übertritt von Blutbestandteilen $> 20\text{kDa}$ in das Gewebe verhindert. Die endotheliale Schicht wird von der Basalmembran umschlossen. Die BHS regelt v.a. den Stofftransport und fungiert als Scheide zwischen Blut- und Hirnkompartment (Hamann et al., 1999a, 1999b).

(2) Die Basalmembran befindet sich zwischen Endothel und dem angrenzendem Gewebe. Ihr vierschichtiger Aufbau lässt sich elektronenmikroskopisch darstellen. Die ersten drei Schichten (Lamina rara externa, Lamina densa und Lamina rara interna) werden als Basallamina (BL) bezeichnet. Die Basalmembran setzt sich somit aus der BL und der vierten Schicht, der Lamina fibroreticularis, zusammen (del Zoppo et al., 2003; Abrahamson et al. 1986). Bei der BL (siehe Abbildung 3 und 4) handelt es sich um eine spezialisierte extrazelluläre Matrix (EZM), die aus über 50 verschiedenen Proteinen und Polysacchariden aufgebaut ist. Die Hauptkomponenten der BL sind die faserbildenden Proteine Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronektin und Elastin, sowie diverse Polysaccharide, v.a. Proteoglycane und Heparansulfate (Hamann et al., 1995). Weitere zelluläre Bestandteile sind beteiligt: Perizyten lagern sich in die BL ein und Astrozyten umschließen sie. Perizyten und Astrozyten bilden zusammen die sog. „second line of defense“ (Krause et al., 1993). Funktionell fungiert die BL als strukturelle Barriere und kann den Austritt von Blutbestandteilen verhindern, wenn die BHS nach zerebraler Ischämie zerstört wurde. Darüber hinaus stellt sie aufgrund unterschiedlicher Proteinladungen ein physiologisches Diffusionshindernis dar (Hamann et al., 1995).

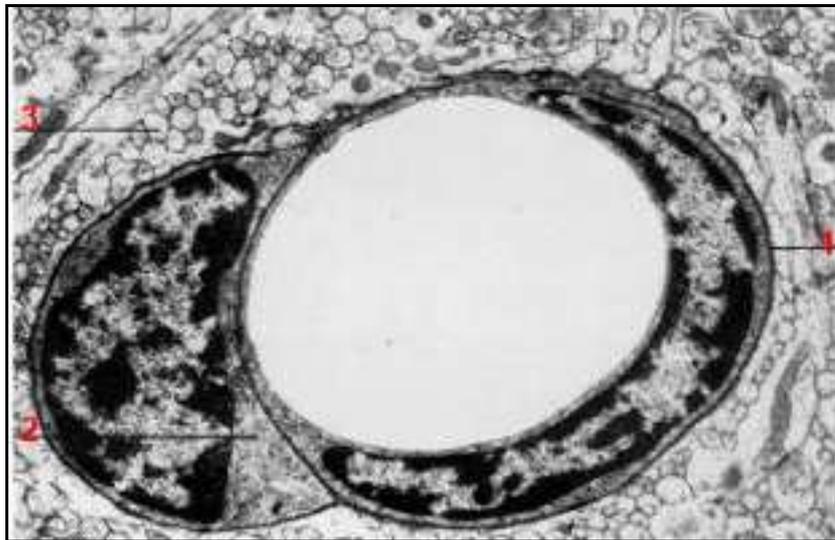


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung einer Basallamina in 14400-facher Vergrößerung. (1) Basallamina, (2) Perizyt und (3) Neurone (modifiziert nach ⁹⁷).

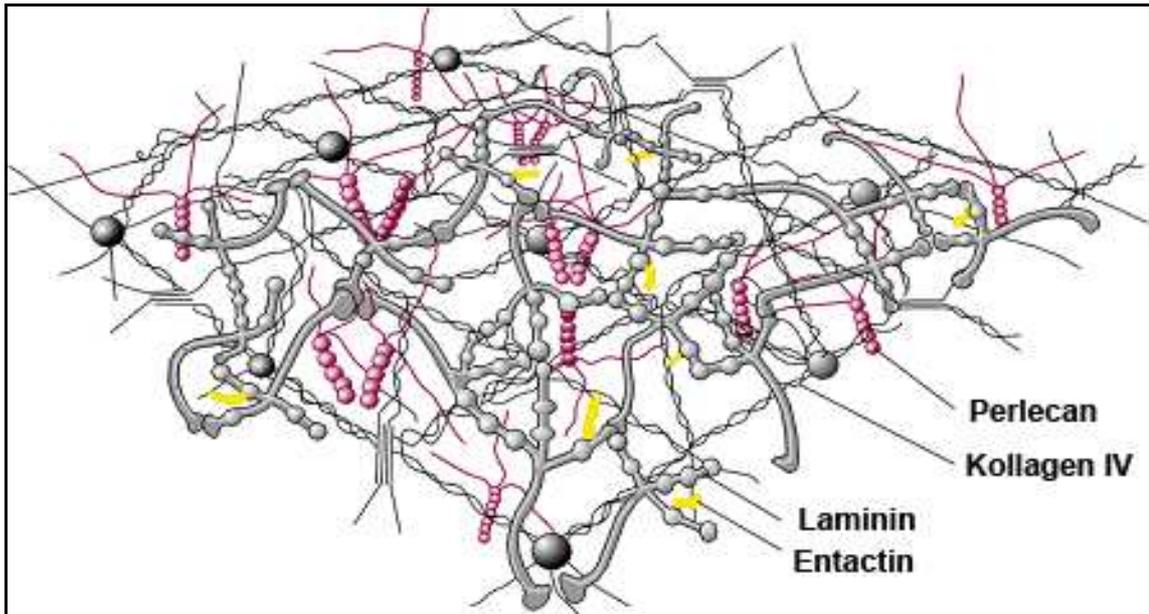


Abbildung 4: Darstellung des strukturellen Aufbaus der Basallamina. Vernetzung von Kollagen IV mit Laminin über Entactin und Perlecan (modifiziert nach ⁹³).

(3) Die Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen die BHS und die BL umfassen, scheinen noch weitere Aufgaben und Funktionen zu haben. So wird vermutet, dass sie einen löslichen Faktor sezernieren, der das Wachstum und die Differenzierung der Endothelzellen, einschließlich der tight junctions, beeinflusst und somit die spezifischen Eigenschaften der BHS aufrechterhält (Estrada et al., 1990; Minakawa et al., 1991; Hurwitz et al., 1993).

Alle drei Barrieren bilden zusammen eine funktionelle Einheit, die sog. „neurovascular unit“, die verhindert, dass Blutbestandteile ins Hirnparenchym übertreten können. Die Integrität der BHS und der BL ist stark von den Interaktionen zwischen den Endothelzellen und Astrozyten abhängig. Die Zellkommunikation wird durch sog. Integrinrezeptoren (Zellmatrix-Adhäsionsmoleküle) gewährleistet. Nach zerebraler Ischämie kommt es zum Zusammenbruch der Permeabilitätsbarrieren und zum Übertritt von Blutbestandteilen in das Hirngewebe. Dadurch kommt es zu sekundären Folgeschäden wie Ödembildungen und Aktivierung der Entzündungskaskade (del Zoppo et al., 2003). Hamann et al. (1996) konnten nach durchgeführter MCA-Okklusion („middle cerebral artery occlusion“) an Pavianen einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung hämorrhagischer Transformationen und der Zerstörung von Komponenten der BL aufzeigen. Besonders in Regionen mit hohem Integritätsverlust der BL kam es nach zerebraler Ischämie zu ausgeprägten hämorrhagischen Transformationen (Hamann et al., 1996).

Es sind bis dato drei proteolytische Mechanismen die zur Schädigung der BL führen bekannt: (1) Die Aktivierung des Plasminogen-Plasmin-Systems, (2) die Freisetzung von Matrixmetallo-Proteinasen und (3) die Aktivierung der Entzündungskaskade durch Sekretion von polymorphkernigen (PMN) Leukozyten-Granula (siehe Abbildung 5). Das Plasminogen-Plasmin-System und das Matrixmetallo-Proteinase System werden in den Kapitel 1.5. und 1.6. näher erläutert.

Nach MCA-Okklusion kommt es zur frühen Transmigration von PMN Leukozyten in die ischämischen Areale (Abumiya et al., 1999). Die Freisetzung der proteolytisch wirksamen Enzyme aus den Leukozyten-Granula führt zur Aktivierung inflammatorischer Reaktionen, die eine schneeballartige Zerstörung der Basalmembranstrukturen hervorrufen können (Hamann et al., 1999).

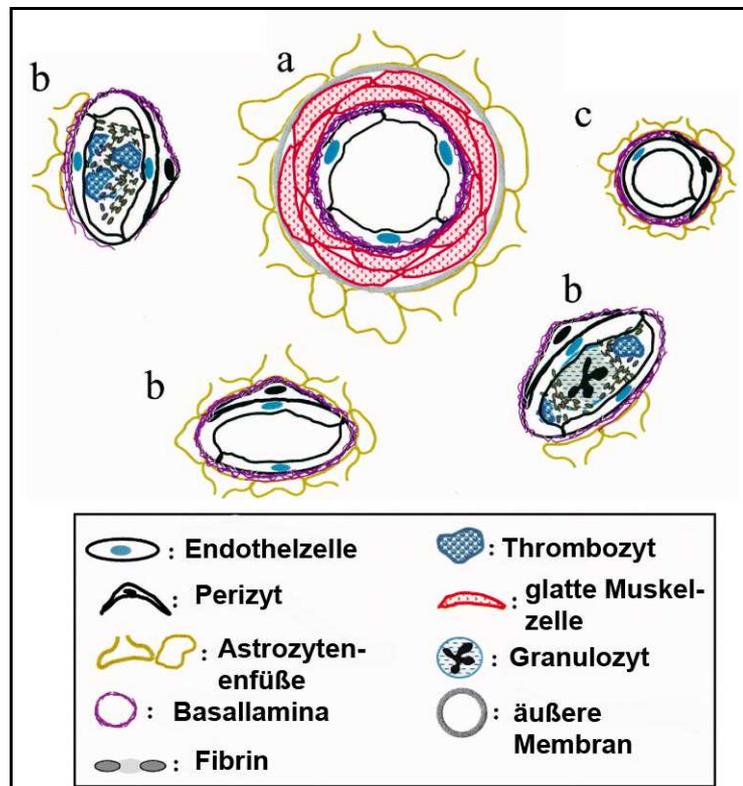


Abbildung 5: Darstellung der Veränderung zerebraler Gefäße nach fokaler Ischämie (a) Prä-kapilläre Arteriole mit offenem Lumen, (b) Post-kapilläre Venole mit PMN Leukozyt oder Thromben und Fibrin, (c) unveränderte Kapillare (modifiziert nach ¹⁶).

1.5. Das Gerinnungssystem

Das Gerinnungssystem zeigt normalerweise ein physiologisches Gleichgewicht zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse. Für die Blutgerinnungskaskade stellt Thrombin das Schlüsselenzym dar, da es die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Die Fibrinmonomere werden, unter Einfluss von Gerinnungsfaktor XII, miteinander quervernetzt und stabilisiert. Die Blutgerinnung wird von vielen weiteren Faktoren mit beeinflusst.

Die Fibrinolyse unterliegt einer Reihe verschiedener Einflussfaktoren. Hierbei spielt das Plasminogen-Plasmin-System (siehe Abbildung 6) eine wichtige Rolle. Eine Schlüsselrolle im Plasminogen-Plasmin-System spielt Plasmin, eine unspezifische Serinprotease. Plasmin besteht aus einer leichten-B-Kette und einer schweren-A-Kette, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Shi et al., 1988; Wu et al., 1987a, 1987b). Plasmin ist die aktivierte Form des Pro-Enzyms Plasminogen (Molekulargewicht 92 k Da), das in der Leber synthetisiert wird. Die Aktivierung zu Plasmin erfolgt enzymatisch durch proteolytische Spaltung der Peptidkette des Plasminogens. Die endogenen Plasminogenaktivatoren (PA) t-PA (tissue plasminogen activator) und u-PA (urokinase-type plasminogen activator) spalten Plasminogen direkt (Rijken et al., 1995) und führen somit zur Aktivierung von Plasmin.

Plasmin baut Fibrin zu löslichen Fibrinfragmenten ab, wodurch es zur Gerinnungslyse kommt (Collen et al., 1980). Es aktiviert einerseits die Fibrinolyse und führt somit zur Auflösung von Blutgerinnsel. Andererseits führt eine überschießende Aktivierung von Plasmin letztlich zum Abbau der BL, wobei Plasmin auf zwei unterschiedlichen Wegen agieren kann: (1) Plasmin hydrolysiert Matrixkomponenten der BM direkt (Hamann et al., 1995) und (2) aktiviert Plasmin Proteasen des MMP-Systems und kann so indirekt zur Schädigung BL beitragen (Pfefferkorn et al., 2000). Außerdem aktiviert Plasmin durch positive Rückkoppelung den PA u-PA direkt.

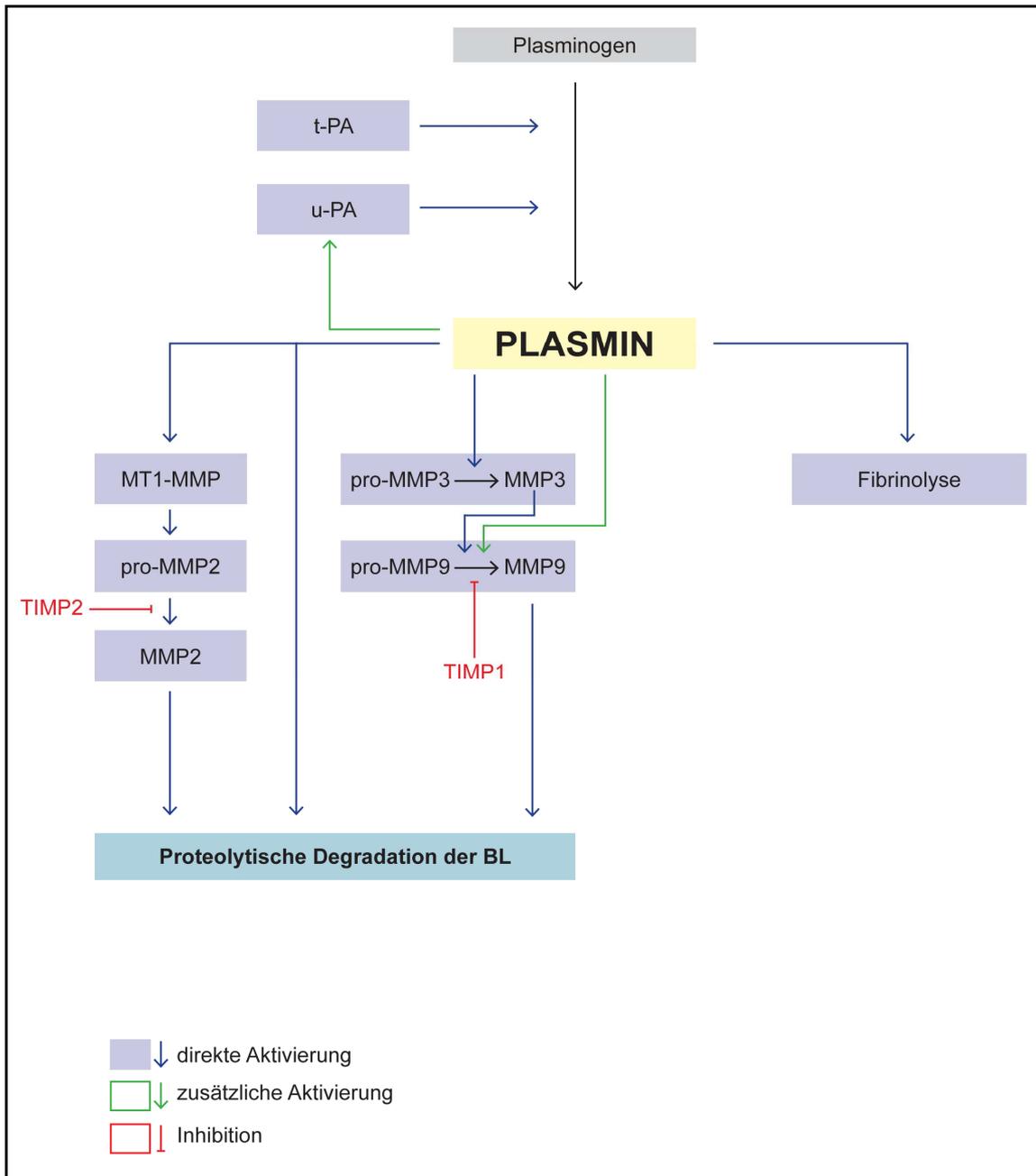


Abbildung 6: Darstellung des Plasminogen-Plasmin-Systems und des Matrixmetallo-Proteinase Systems.

1.6. Die Matrixmetallo-Proteinasen (MMP)

Nach zerebraler Ischämie führen nicht-zelluläre proteolytische Prozesse lokal zur Schädigung der BL. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das MMP-System. Es umfasst bisher 28 bekannte Proteine, von denen 22 im humanen Gewebe existieren. Sie sind zinkabhängige Endopeptidasen, die proteolytisch aktiv sind und verschiedene Komponente der EZM degradieren können (Burggraf et al., 2003).

Nach fokaler zerebraler Ischämie scheinen vor allem MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa) und MMP-9 (Gelatinase B, 92 kDa), deren Substrat Kollagen IV und Laminin ist, für die Schädigung der BL verantwortlich zu sein (Lapchak et al., 2000; Burggraf et al., 2003).

So zeigten Rosenberg et al., 1996 den raschen Anstieg von MMP-9 nach einer MCA-Okklusion in Ratten. Bei der Aktivierung des MMP-Systems (siehe Abbildung 6) spielt auch Plasmin eine Rolle. Plasmin kann die Umwandlung von proMMP-3 zu MMP-3 katalysieren, welches wiederum die Umwandlung von pro-MMP-9 zum aktiven MMP-9 aktiviert (Vempati et al., 2007). MMP-9 kann aber auch direkt durch Plasmin aktiviert werden. Die membrangebundene (MT-MMP) MMP-Form MT1-MMP wird ebenfalls direkt durch Plasmin aktiviert. MT1-MMP wiederum katalysiert die Umwandlung von pro-MMP-2 zu MMP-2 durch seine Interaktion mit TIMP-2, welches als „Brücke“ zwischen MT1-MMP und pro-MMP2 fungiert (Mazzieri et al., 1997; Monea et al., 2002; Sato et al., 1994). Darüber hinaus existieren zahlreiche andere Regulationsmechanismen, beispielsweise auf zellulärer Ebene (Transkription, Translation, Expression usw.), auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.

Gerade MMP-9 scheint für sekundäre Komplikationen, wie Hirnödembildungen und Einblutungen, mitverantwortlich zu sein (Gasche et al., 2001). Rosenberg et al. (1994; 1997; 2001) beschrieben einen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem pro-MMP-9 Anstieg und der Ödembildung in Ratten nach MCA-Okklusion. Darüber hinaus konnten Heo et al., (1999) in Primaten zeigen, dass eine erhöhte Expression von pro-MMP-9 mit hämorrhagischen Transformationen assoziiert ist.

Die proteolytischen Aktivitäten der MMPs werden unter anderem von ihren endogenen Inhibitoren, den sog. TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) kontrolliert. Im physiologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen den Proteasen und den Inhibitoren, so dass eine Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation herrscht (Nagase et al., 1997). TIMPs binden MMPs in einer 1:1 Stöchiometrie. So konnte an zahlreichen experimentellen in-vitro Studien gezeigt werden, dass MMP-9 v.a. von TIMP-1 inhibiert wird. MMP-2 wird überwiegend durch TIMP-2 gehemmt, es kann aber auch durch eine zweite nicht-spezifische Bindestelle durch TIMP-1 und TIMP-3 inhibiert werden (Yu et al., 1997; Cockett et al., 1998). Burggraf et al. (2003) vermuten, dass die Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer Seite entscheidet, ob es zum proteolytischem Abbau oder (Wieder)-aufbau der EZM kommt.

1.7. Die Thrombolysse

Die Reperfusion nach zerebraler Ischämie gilt als der entscheidende Faktor, der den Gewebeschaden im Gehirn minimiert. Eine rasche Rekanalisation und Reperfusion kann durch unterschiedliche lytische Substanzen erzielt werden. Es ist wichtig die Gradwanderung zwischen Nutzen und Schaden des Thrombolytikums richtig auszubalancieren, um die betroffenen Patienten optimal versorgen zu können. Bei der

Beurteilung des jeweiligen Thrombolytikums spielt insbesondere das Risiko der Blutungskomplikationen eine entscheidende Rolle. In dem folgenden Kapitel werde ich verschiedene lytische Agentien vorstellen und versuchen das Risiko-Nutzen-Verhältnis zu beurteilen.

1.7.1. Plasmin als Thrombolytikum

Plasmin ist eine unspezifische Serinprotease, welche eine Schlüsselrolle während der Fibrinolyse spielt und verschiedene extrazelluläre Proteine direkt aktiviert (Parry et al., 2000 und Marder et al., 2001). Obwohl Plasmin die Fibrinolyse direkt beeinflusst, ist es dennoch für die klinische, intravenöse Lysetherapie aufgrund von drei Hauptproblemen eher ungeeignet. (1) Plasmin ist ein Protein, das in neutralen Lösungen sehr instabil und daher schwer pharmakologisch herstellbar ist. Dennoch besteht die Möglichkeit es beispielsweise mit spezifischen Aminosäuren, einem sauren pH oder Glycerol (10-50%) zu stabilisieren (Nagai et al., 2003). (2) Plasmin wird relativ rasch durch seinen, im Blut zirkulierende, physiologischen Inhibitor α_2 -Antiplasmin neutralisiert (Collen et al., 1980). α_2 -Antiplasmin kann Plasmin innerhalb von Sekunden irreversibel in einem Plasmin- α_2 -Antiplasmin-Komplex binden. Wegen der raschen Inaktivierung ist Plasmin daher eher als Agens für die direkte, intraarterielle Therapie anzusehen (Marder et al., 2002). (3) Es kann auch versucht werden, Plasmin indirekt durch die Gabe von Plasminogenaktivatoren zu erhöhen, da die PAs die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin fördern. Problematisch hierbei ist, dass die lytische Plasminwirkung letztlich, von der im Blut vorhandenen Plasminogenkonzentration abhängig ist (Molina et al., 2005).

1.7.2. Mikroplasmin

Mikroplasmin ist ein Derivat von Plasmin, dem die sogenannte „5-kringle Domäne“ fehlt (Shi et al., 1988). Die „5-kringle Domäne“ ist eine Sequenz, welche die Lysin-Bindestelle beinhaltet, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Plasmin und Fibrin, bzw. α_2 -Antiplasmin spielt. Dadurch wird Mikroplasmin im Vergleich zu Plasmin 100-mal langsamer durch α_2 -Antiplasmin inhibiert und hat somit eine längere Halbwertszeit im Blut (4s) als Plasmin (0,02s) (Nagai et al., 2003).

Mikroplasmin ist aus einer leichten-B-Kette und einer schweren-A-Kette aufgebaut (siehe Abbildung 7), die über zwei Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden sind (Wu et al., 1987; Parry et al., 2000). Das Molekulargewicht von Mikroplasmin reduziert sich durch den Verlust der „5-kringle Domäne“ von 88 kDa auf 29 kDa (Shi et al., 1988).

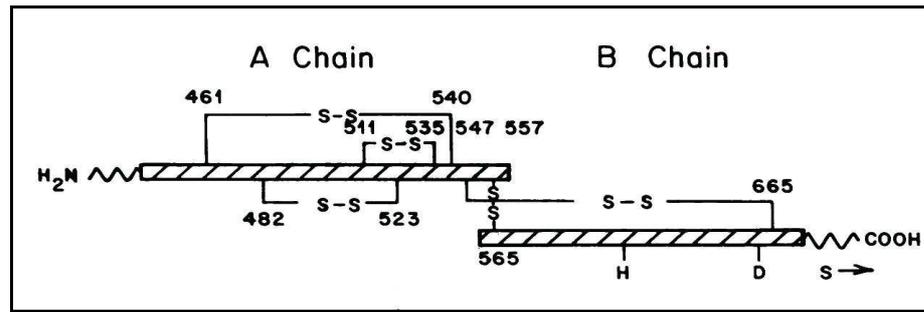


Abbildung 7: Struktureller Aufbau von Mikroplasmin⁹¹.

Mikroplasmin kann pharmakologisch mittels rekombinanter DNA-Technologien synthetisiert werden: rekombinantes humanes Mikroplasminogen wird hierbei in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt, in Mikroplasmin umgewandelt und stabilisiert (Nagai et al., 2003). Es ist ein potentes, alternatives Thrombolytikum. Es wurde bereits im Tiermodell eingesetzt und es wurde bereits gezeigt, dass das Infarktvolume nach MCA-Okklusion in Mäusen reduziert wird (Nagai et al., 2003).

1.7.3. Die Plasminogenaktivatoren (PA)

Die PA spielen bei einer zerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle. Sie katalysieren die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, dem Schlüsselenzym der Fibrinolyse.

Rosenberg et al., (1996; 1998) konnten in Ratten, nach 12 bis 24 Stunden MCA-Okklusion, eine erhöhte u-PA Aktivität feststellen, während die endogene t-PA Konzentration sank. Wang et al. (1998) dagegen konnten eine Erhöhung von t-PA in Mäusen detektieren. Es wird daher vermutet, dass der Anstieg der u-PA und t-PA Konzentrationen nach zerebraler Ischämie das Ausmaß des mikrovaskulären Schadens mit beeinflussen könnte (Schreiber et al., 1998; Ahn et al., 1999; Rosenberg et al., 1999; Burggraf et al., 2004).

1.7.3.1. t-PA

Das derzeit einzige, zugelassene Agens zur systemischen Lysetherapie bei zerebraler Ischämie ist exogen zugeführtes rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator), bzw. Alteplase. Um effizient und risikoarm wirken zu können, muss es innerhalb eines kleinen Zeitfensters von drei bis sechs Stunden nach Ischämiebeginn verabreicht werden.

Die Beurteilungen des Risiko-Nutzen-Verhältnisses der Thrombolyse mit rt-PA sind unterschiedlich. In großen Studien konnte einerseits eine signifikante Verbesserung des klinischen Outcome gezeigt werden, andererseits ist das Nebenwirkungsprofil gravierend. Die wohl am meisten gefürchtete Nebenwirkung ist das um ein 10-faches erhöhte Risiko für eine intrazerebrale Blutung (ICB) (NINDS: The National Institute of

Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; ECASS: European Cooperative Akute Stroke Study Group, 1995). Ein weiterer Nachteil ist das relativ kleine therapeutische Zeitfenster von wenigen Stunden, so dass nur ein kleines Patientenkollektiv therapeutisch erreicht werden kann. Eine Verabreichung von rt-PA außerhalb des Zeitfensters erhöht wiederum das Risiko für Hirnblutungen und andere Gehirnschäden (Clark et al., 1999).

Des Weiteren kritisierten Molina et al. (2005) die niedrige Rekanalisationsrate von nur 50% unter rt-PA Therapie, wodurch das Risiko-Nutzen-Verhältnis fraglich erscheinen mag. Darüber hinaus ist nicht sicher bekannt, ob t-PA eventuell direkt toxisch wirken könnte (Suzuki et al., 2004a, 2004b).

Nichtsdestotrotz, scheint vor allem die Dosis über die Nebenwirkungen von rt-PA zu entscheiden. So zeigten Burggraf et al. (2003) im Rattenmodell, dass niedrig bis moderat dosiertes rt-PA (0,9 und 9 mg/kg KG) einen protektiven Effekt auf die BL hat. Darüber hinaus reduzierte niedrig bis moderat dosiertes rt-PA im Rattenmodell nach 3-stündigen Ischämie und 24h Reperfusion die Infarktgröße und den Gehirnschaden (Grobholz et al., 2005). Höher dosiertes rt-PA (18 mg/kg KG) dagegen geht mit einer maximalen Degradation von Kollagen IV im betroffenen ischämischen Areal einher. Eine mögliche Erklärung für diesen verstärkten mikrovaskulären Schaden könnte die gleichzeitige, signifikante Erhöhung und Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 liefern (Burggraf et al., 2003).

1.7.3.2. u-PA

Die Protease Urokinase (u-PA, urokinase-type plasminogen activator, Molekulargewicht 54 kDa) wird in den epithelialen Zellen des Nierentubulus synthetisiert und kommt in hoher Konzentration im Urin vor. Endothelzellen hingegen synthetisieren die Pro-Urokinase, das sogenannte „single-chain u-PA“ (scu-PA). Diese schwach aktive scu-PA wird bereits durch geringe Mengen an Plasmin in die aktive zwei-kettige Form („two-chain u-PA, tcu-PA) überführt. Diese Umwandlung und andere zellulären Funktionen des u-PA werden v.a. über seinen an einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) befestigten u-PA-Rezeptor vermittelt. Durch die Bindung von u-PA an seinen Rezeptor verstärken sich die proteolytischen Eigenschaften von u-PA. Der u-PA-Rezeptor wurde auf vielen Zellen, z.B. Endothelzellen oder Monozyten nachgewiesen. Ein weiterer wichtiger Weg für die Steigerung der u-PA Aktivität stellt der positive Rückkoppelungsmechanismus des Plasmins dar. Die Elimination erfolgt sowohl durch PAI (Plasminogenaktivator Inhibitor) als auch hepatisch.

Während zerebraler fokaler Ischämie kommt es zum Anstieg der u-PA Aktivität. Burggraf et al. (2004) zeigten im MCAO-Modell an Ratten, dass vor allem hohe rt-PA

Dosen (18 mg/kg KG) die endogene u-PA Aktivität signifikant erhöhen. Die stärkste Erhöhung von u-PA konnte in den Basalganglien detektiert werden. Im Gegensatz dazu, blieb die t-PA Aktivität von allen rt-PA Konzentrationen unbeeinflusst. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden t-PA Anstieg bei gleichzeitiger Hochregulierung der u-PA Aktivität könnte Folgendes liefern: u-PA wird sehr früh durch TNF α und β (Tumornekrosefaktor) stimuliert, welche die Endothelzellen nicht zur Synthese von t-PA stimulieren (Docagne et al., 1999). Daher könnte das mikrovaskuläre Endothelium für die ischämiebedingte Steigerung der u-PA Konzentration verantwortlich sein (Burggraf et al., 2004). Der genaue Mechanismus der endogenen PAs und ihr Einfluss auf den mikrovaskulären Integritätsverlust nach zerebraler Ischämie bleibt weiterhin unklar.

1.7.4. Der Vergleich von Mikroplasmin und rt-PA

Mikroplasmin ist ein Plasminderivat, das die Fibrinolyse direkt aktiviert und somit unmittelbar ein Blutgerinnsel auflösen kann. Im Gegensatz dazu ist die thrombolytische Wirkung der Plasminogenaktivatoren von der lokalen Plasminogenkonzentration im Blut abhängig (Molina et al., 2005). Während durch die Gabe von rt-PA das Blutungsrisiko um das 10-fache erhöht wird (NINDS, 1995), konnte Suzuki et al. (2004a) zeigen, dass Mikroplasmin, im MCAO-Modell in Mäusen, die Verlängerung der Blutungszeit, sowie sekundäre Blutungen weniger stark beeinflusst als t-PA. Mikroplasmin könnte somit ein geringeres Risiko für eine ICB haben (Suzuki et al., 2004a). Darüber hinaus verbesserte sich im Verhaltenstest unter Mikroplasmingabe der Neuroscore nach intrazerebraler Embolisation im Kaninchenmodell, während das Blutungsrisiko nicht anstieg (Lapchak et al., 2002a).

Gerade die Dosierung von rt-PA ist für das Blutungsrisiko entscheidend. So konnte in experimentellen Untersuchungen nach zerebraler fokaler Ischämie gezeigt werden, dass sich v.a. höhere rt-PA Dosen zu einer signifikanten Steigerung der Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA führen und somit Einfluss auf das Plasminogen-Plasmin-System nehmen, das bereits ohne exogenes rt-PA nach Ischämie aktiviert wird. Yamaguchi et al. führten 2006 eine klinischen Studien an 103 Schlaganfallpatienten durch. Die Patienten erhielten innerhalb eines Zeitfensters von drei Stunden ein niedrig dosiertes rt-PA (0,6 mg/kg) anstatt der international empfohlenen hohen Dosis (rt-PA 0,9 mg/kg). Es zeigte sich, dass die Patienten, die das niedrig dosierte rt-PA erhalten hatten, von einem besseren Outcome profitierten und unter weniger symptomatischen intrakraniellen Blutungen litten. Da die richtige Dosierung von rt-PA eine große Rolle spielt, ist es wichtig den Einfluss von Mikroplasmin auf das neuronale und mikrovaskuläre System in unterschiedlichen Konzentrationen zu untersuchen, um diese miteinander vergleichen zu können.

2. Fragestellungen

Die zurzeit für die systemische Lyse einzige zugelassene Therapie ist die Gabe von intravenös appliziertem rt-PA. Der limitierende Faktor einer rt-PA Therapie ist das zu hohe Nebenwirkungsrisiko mit seinen potentiell tödlichen Folgen.

Demnach müssen dringend alternative Thrombolytika gefunden werden, die ein gutes Outcome haben und ein besseres Risiko-Nutzen-Verhältnis aufweisen, um die betroffenen Patienten effizient und risikoarm versorgen zu können. Mikroplasmin stellt ein potentiell wirksames Thrombolytikum dar, dessen Einfluss nach zerebraler fokaler Ischämie auf das mikrovaskuläre System analysiert und kritisch beurteilt werden sollte. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Mikroplasmin auf die mikrovaskuläre Integrität der Basallamina und auf die degradierenden proteolytischen Systeme nach MCA-Okklusion im Rattenmodell zu untersuchen, um einen Vergleich der Wirkungen des neuen Thrombolytikums Mikroplasmin mit dem etablierten rt-PA erreichen zu können.

Dabei galt es folgende Fragen beantworten zu können:

1. Welchen Einfluss hat Mikroplasmin nach drei Stunden Ischämie und 24 Stunden Reperfusion auf die Infarktgröße?
2. Wie beeinflusst Mikroplasmin nach MCA-Okklusion die *morphologische* Integrität der Basallamina, bzw. den Kollagen Typ IV Gehalt der Basallamina?
3. Welchen Einfluss hat Mikroplasmin auf die *funktionelle* Integrität der Basallamina, in Bezug auf die Extravasation in das Hirngewebe?
4. Wie beeinflusst Mikroplasmin die nicht-zellulären proteolytischen Prozesse, die unter anderem für die Schädigung der Basallamina verantwortlich sind, wie die Matrix-Metallo-Proteinase (MMP-2 und MMP-9 und deren endogene Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2) oder die Plasminogenaktivatoren (t-PA und u-PA)?
5. Könnte Mikroplasmin ein alternatives Agens sein, welches das Risiko-Nutzen-Verhältnis verbessert, indem es das Outcome steigert und gefährliche Nebenwirkungen, wie das Blutungsrisiko, senkt?
6. Gibt es eine Konzentrationsabhängigkeit der obigen Wirkungen von Mikroplasmin?

3. Material und Methoden

3.1. Das Fadenmodell

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen von Mikroplasmin auf das Gehirn während einer transienten, fokalen, zerebralen Ischämie untersucht werden. Es wurde dabei das Modell der MCA-Okklusion („middle cerebral artery occlusion“) verwendet. Dieses basiert auf der von Longa et al. (1989) etablierten Methode der intraluminalen Gefäßokklusion. Die Operation der Versuchstiere wurde von Herrn Dr. Andreas Trinkl durchgeführt. Die anschließende Gewebsaufarbeitung und die immunohisto- und biochemischen Färbungen, sowie die digitale Weiterverarbeitung wurden von der Autorin als experimenteller Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

3.1.2. Der Versuchsaufbau

Alle Versuchstiere waren ca. 8–9 Wochen alte, männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 280g bis 300g.

Die Ratten wurden in einem Makrolon Käfig (Pereg, Techniplast 95cm x 45cm x 21cm) gehalten. Es herrschten die gesamte Zeit über konstante Rahmenbedingungen: Luftfeuchtigkeit (50% - 70%), Raumtemperatur (RT 22°C ± 4°C) und ein Hell-/Dunkelrhythmus von jeweils 12h (Licht von 7:00h–19.00h). Futter und Wasser standen den Tieren zu jedem Zeitpunkt unbegrenzt zur Verfügung. Nach der Ischämie (I) von 3h wurden die Tiere für die Reperfusion (R) von 24h in Einzelkäfigen gehalten.

3.1.2.1. Das middle cerebral artery occlusion (MCAO)-Modell

Die Tiere waren während der Experimente voll narkotisiert. Die Ischämieinduktion für 3h mit anschließender Reperusionszeit von 24h wurde bei alle Tieren gleich (I3 R24) durchgeführt.

Die Tiere wurden mit einem Inhalationsgemisch aus Isofluran[®], Lachgas und Sauerstoff (70% N₂O, 30% O₂, 2% Isofluran[®]) narkotisiert und anschließend intubiert. Die Ratten blieben bis zum Beginn der Reperfusion in Narkose. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Vergrößerung 65-fach) wurde mittels Inzision ein etwa zwei Zentimeter langer, ventro-medianer Halsschnitt, unter Schonung des N. vagus, gesetzt. Die A. carotis communis dextra wurde, auf Höhe der Bifurkation in A. carotis externa und A. carotis interna, freipräpariert und mobilisiert.

Die A. carotis communis wurde distal ligiert und anschließend proximal punktiert, um ein Stück Polyethylenschlauch (PE 50) in diese einführen zu können. In den Polyethylenschlauch wurde vorher ein chirurgischer monofilärer Nylonfaden platziert, der nun unter Sicht anterograd, ca. 19 mm ab Bifurkation, in die A. carotis interna

vorgeschoben wurde, wobei die Fadenspitze den Abgang der A. cerebri media von der A. carotis interna verschließen sollte (siehe Abbildung 8). Der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) wurde mittels einer, auf der ischämieseitigen Schädelkalotte platzierten, Laser-Doppler-Fluss-Sonde (LDF) registriert und mittels PC-System mit dem Prozessdatenerfassungssystem Perisoft (Perimed-Programm, Perimed, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet.

Nach 3h Ischämie wurde der Faden zurückgezogen und entfernt. Die Wunde wurde genäht und die Narkose beendet. Für die somit eingeleitete Reperfusion von 24h wurden die Ratten in Einzelkäfige untergebracht, wo sie mit Futter und Wasser ad libitum versorgt wurden.

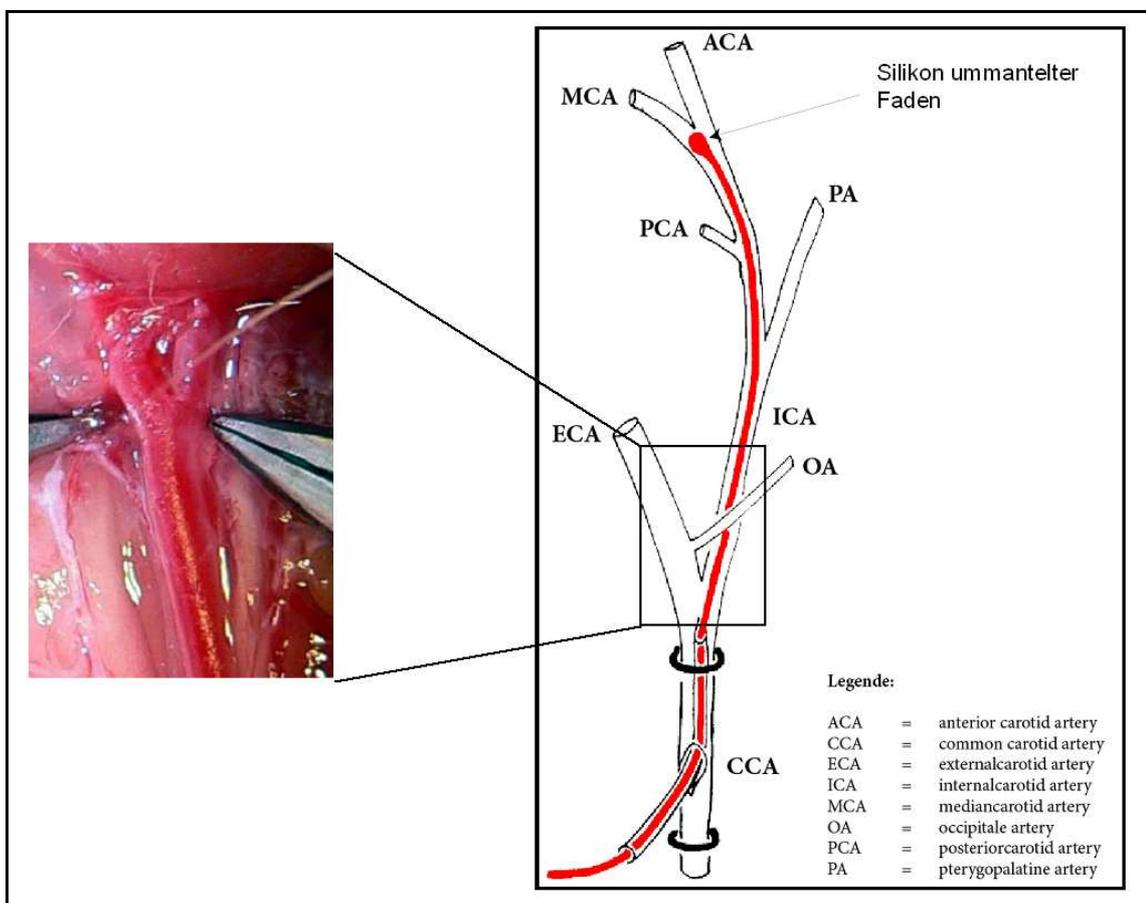


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Fadenvorschubs während der MCA-Okklusion der Ratte (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dr. H. Martens).

Nach 24h Reperfusion wurde der neurologische Schaden anhand von zwei Verhaltenstests (Garcia-Test und Licking Test) ermittelt.

Am Ende des Experiments wurden die Tiere abermals stark narkotisiert und nach Eröffnung des Brustkorbes transkardial mit 100 ml eisgekühlten BSA-Gemisches perfundiert. Nach Perfusion wurden die Gehirne entnommen und die Schädelbasis inspiziert, um makroskopisch hämorrhagische Blutungen ausschließen zu können. Die Gehirne wurden bei -80°C für spätere Untersuchungen tiefgefroren.

Es wurden fünf Gruppen mit verschiedenen Mikroplasminkonzentrationen (0,5mg, 1mg, 2,5mg 5mg und 10mg) operiert. Zu den unterschiedlich behandelten Mikroplasmingruppen wurden zwei weitere Tiergruppen untersucht, die Kontrollgruppe und die Shamgruppe. Die Kontrollgruppe umfasst die Tiere, bei denen anstelle von Mikroplasma eine physiologische Natriumchloridlösung (NaCl) injiziert wurde. Bei der zweiten Gruppe, die sogenannte Shamgruppe, handelt es sich um schein-operierte Tieren. Bei diesen wird der Faden zwar, mittels des oben genannten Polyethylenstücks, in die A. carotis communis eingebracht, aber nicht in die A. carotis interna vorgeschoben, so dass die A. cerebri media nicht okkludiert und somit die Blutversorgung im Mediastromgebiet nicht beeinträchtigt wurde.

Für die folgende Immunhistochemie und Biochemie wurden die einzelnen Gehirne von frontal nach dorsal im Kryostat bei -20°C aufgeschnitten (Dicke/Schnitt: 10 µm) und auf nummerierte Objektträger aufgezogen (Burggraf et al., 2003). Die Schnitte wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

3.1.2.2. Die Messverfahren

3.1.2.2.1. Die Vitalparameter

Die Körpertemperatur wurde mittels einer rektalen Temperatursonde bestimmt und mit Hilfe eines adaptiven Heizkissens konstant auf 37°C ± 0,5 °C gehalten (siehe Abbildung 9).

Bei der Etablierung der Methode wurde zusätzlich der systemische arterielle Blutdruck fortlaufend bestimmt. Darüber hinaus wurde die Beatmungssituation durch wiederholte Blutgasanalysen überwacht.

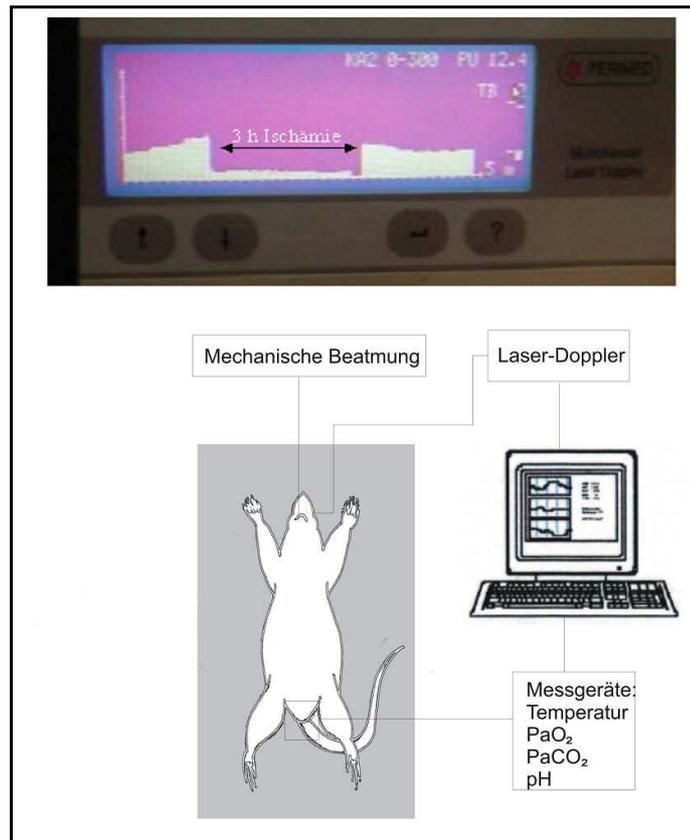


Abbildung 9: Darstellung des Versuchsaufbaus beim Fadenmodell (mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Trinkl).

3.1.2.2.3. Die Laser-Doppler-Blutflussmethode (LDF)

Mit der LDF-Methode wird der regionale zerebrale Blutfluss in der kapillären Mikrozirkulation nicht-invasiv gemessen. Die Messung basiert auf dem sogenannten Dopplereffekt bewegter Teilchen, z.B. Blutzellen. Dazu wird auf der Hirnoberfläche ein faseroptisches Kabelende platziert, das Licht eines Diodenlasers ins Gewebe sendet und ein Messvolumen von ca. 1mm^3 bewegte und stationäre Zellen erfasst. Das reflektierte Licht wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und analysiert. Das Signal entspricht der Durchschnittsfließgeschwindigkeit aller Blutzellen in einem vorgegebenen konstanten Messvolumen. Da die Blutvolumenverschiebung pro Zeitintervall dem Blutfluss entspricht, kann man mit der LDF-Methode den Nettoblutfluss der Mikrozirkulation in dem betrachteten Bereich messen. Die Methode liefert allerdings keine absoluten Blutflusswerte (in $\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$), sondern relative Werte, d.h. die prozentuale Abweichung von einem stabilen Ausgangswert, der gleich 100% gesetzt wurde (Dirnagl et al., 1989, Smits et al., 1986).

Vorteil dieser LDF Methode ist die genaue Verifizierung des Blutflusses im Versorgungsgebiet der A. cerebri media, was die Variabilität des Schadens mindert und die Reproduzierbarkeit des Infarktgeschehens ermöglicht. Ferner kann durch die LDF Methode die Ischämiezeit exakt bestimmt und kontrolliert werden. Während des

Verschlusses der A. cerebri media kommt es zum Absinken des regionalen zerebralen Blutflusses auf 70%. Wird der Faden zurückgezogen, kommt es zum Wiederanstieg des Blutflusses, wodurch die Rekanalisation einsetzt.

3.1.2.2.3. Die Applikation von Mikroplasmin

Die Verabreichung der jeweiligen Mikroplasminmenge basierte auf der von Burggraf et al. (2003) beschriebenen Methode der rt-PA Gabe. Hierbei wurde Mikroplasmin intravenös über einen, in der Vena jugularis externa dextra liegenden, Katheter (PE 50) infundiert. 2,5h nach Ischämiebeginn wurden 10% der Gesamt-Mikroplasminmenge als Bolus appliziert. Die restlichen 90% wurden als Infusion über einen Zeitraum von 1h (also 30min über die Ischämiezeit hinaus) mittels eines externen Pumpsystems (mini-pump, TSE systems, Bad Homburg, Deutschland) verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten physiologische Kochsalzlösung ohne Zusatz von Mikroplasmin.

3.3. Die experimentellen Gruppen

Die nachfolgenden Versuchsreihen wurden durchgeführt (I3R24). Es wurden unterschiedliche Mikroplasmindosen verwendet. In früheren tierexperimentellen Untersuchungen wurde 10mg rt-PA verwendet, da diese Dosierung am ehesten der klinischen Patientendosis von 1mg/kg KG entspricht (Chen et al., 2007). Um den Effekt von rt-PA direkt mit Mikroplasmin vergleichen zu können, wurden die ersten Versuche mit 10mg Mikroplasmin durchgeführt. Nachdem die ersten Vorversuche mit 10mg Mikroplasmin sehr vielversprechend waren, wurden weitere niedriger dosierte Mikroplasmingruppen designt (0,5 mg, 1mg, 2,5mg und 5mg Mikroplasmin), um die niedrigste Mikroplasmindosis mit dem besten therapeutischen Nutzen-Risiko-Verhältnis ausfindig machen zu können.

Insgesamt wurden 69 Tiere operiert. Es verstarben insgesamt 6 Tiere während oder kurz nach dem Eingriff (Mortalität: 8,7%), zwei weitere Tiere wurden ausgeschlossen, das sich kein LDF Abfall detektieren ließ.

- Gruppe 1: Kontrollgruppe (n=8) 1,5mg NaCl/kg KG in 60 min
- Gruppe 2: 0,5mg Mikroplasmintiere (n=6) 0,5mg Mikroplasmin/kg KG in 60 min
- Gruppe 3: 1mg Mikroplasmintiere (n=6) 1mg Mikroplasmin/kg KG in 60 min
- Gruppe 4: 2,5mg Mikroplasmintiere (n=7) 2,5mg Mikroplasmin/kg KG in 60 min
- Gruppe 5: 5mg Mikroplasmintiere (n=13) 5mg Mikroplasmin/kg KG in 60 min
- Gruppe 6: 10mg Mikroplasmintiere (n=15) 10mg Mikroplasmin/kg KG in 60 min
- Gruppe 7: Shamgruppe (n=6) schein-operiert

3.4. Die Verhaltensstudien

Die neurologischen Verhaltenstests wurden bei jedem Tier zweimal durchgeführt. Das erste Mal vor der geplanten Operation, das zweite Mal nach 24h Reperfusion. Die Tests wurden als Doppelblind-Versuche durchgeführt, wobei die Untersucher keine Kenntnis über die Behandlung des jeweiligen Tieres hatten. Es wurden der Garcia Test (Garcia et al., 1993) und der Licking Test (Gulyaeva et al., 2003) eingesetzt.

3.4.1. Der Garcia Test

Bei diesem Test werden neurologische Defizite bestimmt, die anhand von Neuroscores klassifiziert werden können. Für jede Teilaufgabe wird eine maximale Punktzahl vergeben, die sich summieren. Am Ende des Tests erhält man einen Wert zwischen 0 Punkten, bei schwer erkrankten, und 18 Punkten bei gesunden Tieren.

Die klinische Beurteilung setzt sich aus folgenden Kriterien (jeweils 0-3 Punkte) zusammen, wobei drei Punkte kein neurologisches Defizit bedeuten:

- a) spontane motorische Aktivität in einer neuen Umgebung
- b) symmetrisches Abspreizen aller vier Gliedmaßen bei Hochheben am Schwanz (bei Z.n. Apoplex ist die kontralaterale Seite eingeschränkt)
- c) Symmetrie der Vordergliedmaßen bei partiellem Hochheben am Schwanz mit Stand auf den Vorderpfoten
- d) Motorik/Haltevermögen an senkrechtem Gitter
- e) Vergleich der Reaktion auf Schmerzreiz an beiden Thoraxhälften
- f) Vergleich der Reaktion auf stumpfe Stimulation der Vibrissen

3.4.2. Der Licking Test

Mit dem Licking Test sollte die Motorik der Zunge vor und nach Ischämie überprüft werden (Gulyaeva et al., 2003). Mit diesem Test konnte der neurologische Schaden nach Ischämie exakt, einfach, zeitsparend und kostengünstig ermittelt werden. Darüber hinaus ist der Licking Test mit anderen neurologischen Verhaltenstests vergleichbar, wodurch eine zusätzliche Kontrolle erzielt werden konnte.

Einige Tage vor dem geplanten Eingriff wurden die Tiere auf Erdnussbutter in einem hohen Röhrchen konditioniert (siehe Abbildung 10). In den Genuss der Erdnussbutter konnten die Ratten nur gelangen, indem sie geschickt mit ihrer Zunge das Röhrchen ausleckten. Kurz vor der Operation wurde den Tieren ein 0,6 cm breites und 2,5 cm langes, mit Erdnussbutter gefülltes, Röhrchen zur Verfügung gestellt. Wie tief ein gesundes Tier mit der Zunge lecken konnte wurde gleich 100% gesetzt. Am Ende der Reperfusionszeit wurde das Experiment wiederholt und die prozentuale Abweichung vom Ausgangswert ermittelt.

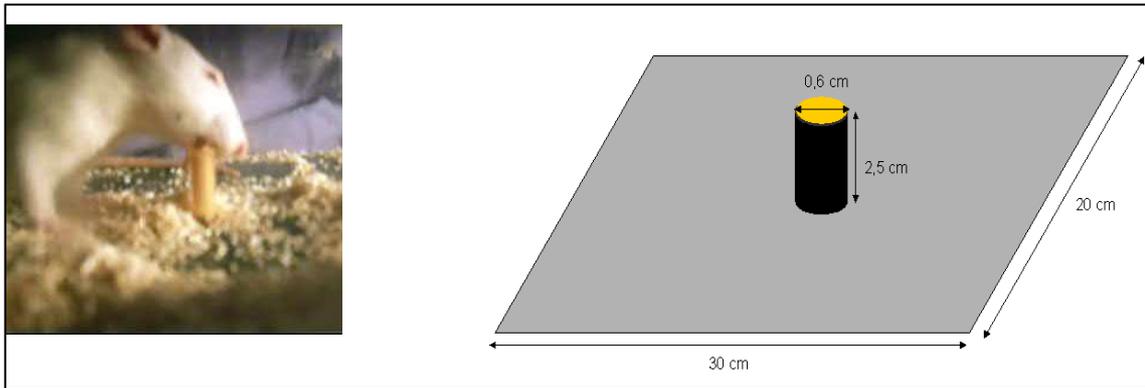


Abbildung 10: Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus beim Licking Test (mit freundlichen Genehmigung von Dr. A. Trinkl).

3.5. Die immunhistochemischen Verfahren

Mit Hilfe direkter und indirekter immunhistochemischer Methoden kann man den mikrovaskulären Schaden quantifizieren und dokumentieren. Die Masterprotokolle und Rezepte für die verwendeten Lösungen sind im Anhang (Kapitel 8) dokumentiert.

3.5.1. Die Nissl Färbung

Mit Hilfe der Nissl Färbung mit dem Farbstoff „Kresylviolett“ kann das Infarktvolumen bestimmt werden. Bei der Nissl Färbung nehmen sowohl das endoplasmatische Retikulum als auch die sogenannten „Nissl-Schollen“, also die Ribosomen der Neurone, den basischen Farbstoff auf und lassen sich darstellen (siehe Abbildung 11). Da es in der frühen Phase der Ischämie zur Aktivierung von Proteasen kommt, welche u.a. das endoplasmatische Retikulum, bzw. ribosomale endoplasmatische Retikulum abbauen, sind betroffene Areale bei der Nissl Färbung demarkiert und somit identifiziert.

Alle 550 μm der aufgeschnittenen Rattenhirne wurde ein 10 μm dicker Hirnschnitt mit Kresylviolett angefärbt und für die spätere volumetrische Auswertung eingescannt (Seiko Epson, Nagano, Japan).

Die Vorteile der Nissl Färbung gegenüber der konventionellen TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) Färbung liegen auf der Hand. (1) TTC muss bereits prä-mortem injiziert werden. (2) nach TTC ist keine weitere histologische oder biochemische Analyse mit anderen Antikörpern mehr möglich (Kloss et al., 2002).

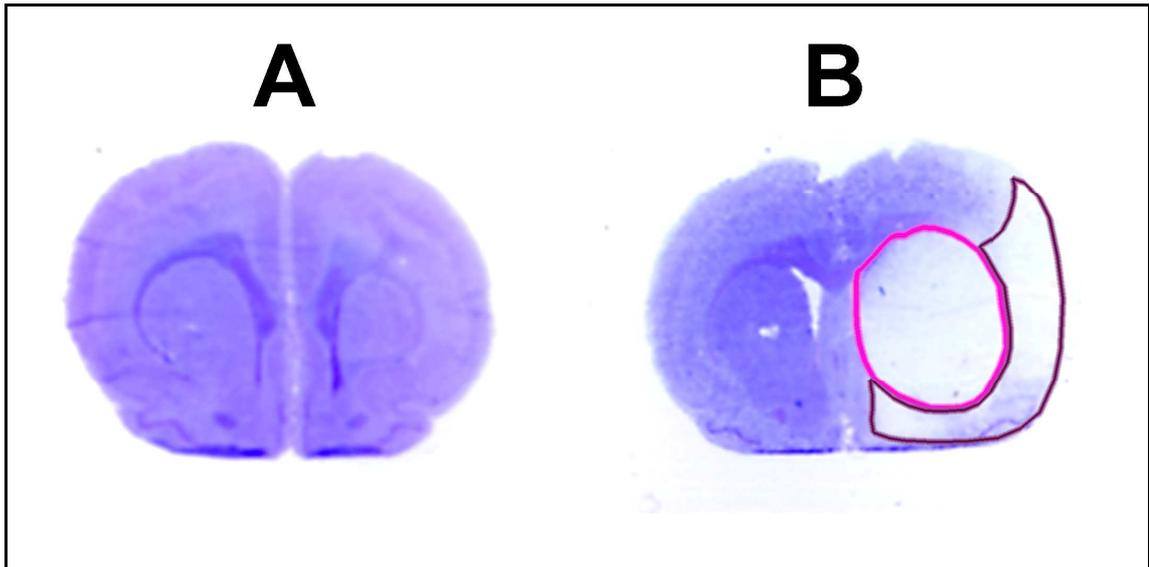


Abbildung 11: Darstellung Nissl gefärbter Gehirne. (A) zeigt ein scheinoperiertes Gehirn ohne Infarkt und (B) stellt ein Mikroplasmintier mit eingezeichnetem Infarktareal dem Kortex und in den BG dar.

3.5.1.1. Die Infarktgrößenbestimmung (Volumetrie)

Die mit Nissl gefärbten und digitalisierten Schnitte wurden mit Hilfe von OPTIMAS 6.2 Imaging Software und EXCEL (Microsoft, Seattle, WA, USA) ausgewertet. Die Infarktareale, gut abgrenzbar durch die Nissl-Färbung, wurden manuell polygonisiert um den Flächeninhalt des Infarktareals bestimmen zu können. Anschließend wurde das Volumen mit der mathematischen Formel nach Kloss (Kloss et al., 2002) berechnet.

3.5.2. Immunhistochemie für Kollagen Typ IV

Da Kollagen IV ein wesentlicher Bestandteil der Basallamina ist, kann durch die Immunhistochemie die Integrität der Basallamina und somit das mikrovaskuläre System überprüft werden (Hamann et al., 1995; Hamann et al., 2002).

Hierfür wurden die Gefrierschnitte zunächst durch ein Aceton/Chloroform-Gemisch (1:1) fixiert und anschließend mit PBS (pH = 7,4) gespült. Um unspezifische Bindungen zu lösen, wurden die Hirnschnitte für 20 min mit Blotto inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte mit dem Ziegen Primärantikörper (Goat Anti-Type IV Collagen-UNLB, Southern Biotechnology associates, Inc., Birmingham, AL, USA), der mit reagent dilution im Verhältnis 1:800 verdünnt wurde. Zwischen allen folgenden Schritten wurden die Schnitte mehrmals mit PBS gespült. Als Sekundärantikörper (biotinylated anti-goat IgG (H+L), Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010) wurde ein gegen Goat-IgG gerichteter Pferde Antikörper verwendet. Dieser wurde in der Verdünnung 1:200, in PBS, Horse-serum und 10% Tween 20 gelöst. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, wurden die Schnitte in Wasserstoffperoxid getaucht. Zur Signalverstärkung wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Komplex

(Vectastain-Elite-Kit, Vector Laboratories), einer exogenen Peroxidase nach Anweisung des Herstellers inkubiert. Als Chromogen wurde AEC (3-amino, 9-ethyl-carbazole, AEC-Kit, Biomedica Corporation, Foster City, CA, USA) nach Gebrauchsanweisung verwendet, das die exogenen Peroxidasen umsetzt und eine spezifische, positive Farbreaktion (rötlich) erscheinen lässt. Die Reaktion wurde abschließend durch 3-minütiges Spülen mit Leitungswasser gestoppt.

Am nächsten Tag wurden die getrockneten Schnitte mit Hilfe von Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Germany) eingedeckelt.

3.5.2.1. Videoimagingauswertung der Kollagen Typ IV Schnitte

Zur Quantifizierung der Mikrogefäße und der Gefäßdichte wurden die Infarktareale, sowie die kontralaterale Kontrollhemisphäre durch den Einsatz einer 3-chip-Videofarbkamera digitalisiert.

Die Videoimagingauswertung wurde an Kollagen IV gefärbten Schnitten durchgeführt. Zum Digitalisieren wurde ein Zeiss Axiophot Mikroskop (Göttingen, Deutschland) mit 5-fachem Objektiv verwendet. An das Mikroskop war eine Sony Power HAD 3CCD Videokamera (Sony, Tokyo, Japan) angeschlossen und mit einem Computer verbunden. Ein automatisierter Motor fährt den eingespannten Objektträger mit den Kollagen IV gefärbten Schnitten schrittweise ab und speichert die Daten. Die Bilder werden mit Hilfe einer computerunterstützten Videobildanalyse vermessen und erneut gespeichert, um eine spätere Überprüfung der erfassten Daten zu gewährleisten (siehe Abbildung 12).

Die auf den Computer übertragenen Daten wurden mit OPTIMAS und EXCEL weiter bearbeitet. Innerhalb eines Hirnschnittes wurden einzelne Areale sog. ROIs (regions of interest) markiert und definiert. Anhand dieser ROIs kann die mikrovaskuläre Schädigung quantifiziert werden.

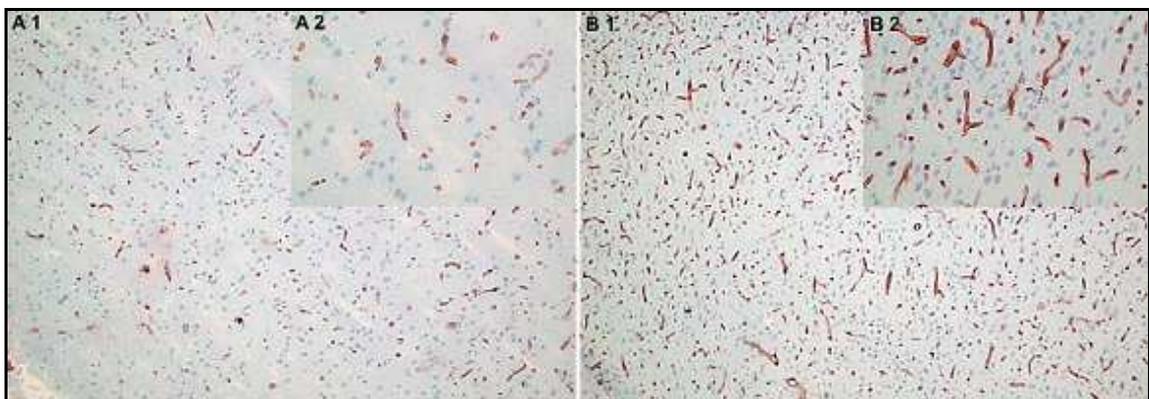


Abbildung 12: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ IV. (A2) und (B2) stellen jeweils eine Vergrößerung des Bildausschnitts dar. Darstellung der Degradation von Kollagen Typ IV nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion der Kontrollgruppe (A1) (mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Trinkl).

3.6. Die biochemische Aufarbeitung

Nach Identifikation der ROIs (regions of interest), durch immunhistochemische Auswertungen, wurden biochemische Analysen an Schnitten mit der größten Infarktausdehnung (± 1 mm vom Bregma entfernt) durchgeführt werden.

Um die Proteine aus den 10 μ m dicken Hirnschnitten zu gewinnen, wurde jedes Gehirn in vier Regionen unterteilt (siehe Abbildung 13) und von den Objektträgern mit Hilfe eines scharfen Skalpellles abgekratzt (Burggraf et al., 2003):

- A) Kortex ischämische Hemisphäre
- B) Basalganglien ischämische Hemisphäre
- C) Kortex kontralaterale Hemisphäre
- D) Basalganglien kontralaterale Hemisphäre

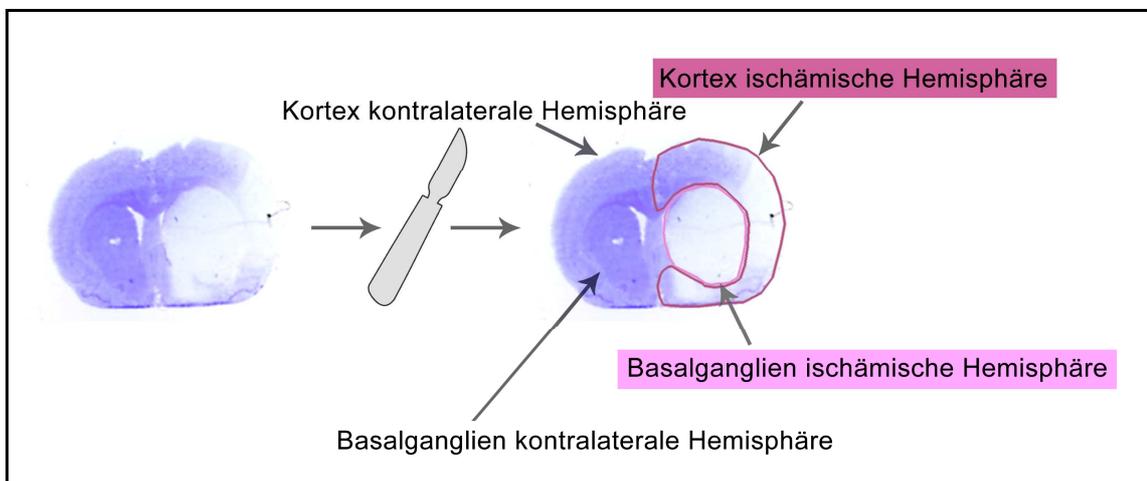


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gewinnung des Gewebematerials für die weiteren biochemischen Aufarbeitungen des Gehirns. Unterteilung des Gehirns in vier Regionen.

Das gewonnene Hirnmaterial wurde bei RT mit einem Homogenisierungspuffer, der an den jeweiligen Test angepasst war, versetzt, gevortext und im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 U/min zentrifugiert und die Überstände für die Western Blots und Zymographien abgenommen. Der jeweilige Auftragspuffer und die zu untersuchenden Proben wurden zu einem Gemisch zusammengefügt. Abschließend wurde das Gemisch auf die Gele aufgetragen und die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-(SDS)-Elektrophorese (SDS-PAGE) gestartet. Die SDS-Elektrophorese wird standardmäßig zur Analyse von Proteingemischen verwendet, bei der das anionische Detergens Natriumlaurylsulfat (englisch sodium dodecyl sulfate, SDS) eingesetzt wird. Als Trägermaterial diente hierbei ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Unter elektrischer Spannung werden die Proteine elektrophoretisch entsprechend ihrer Molmasse getrennt. Es wandern kleine Proteine weiter als große, so dass am Ende des Vorgangs alle Proteine ihrer Größe nach aufgereiht sind und als entsprechende Proteinbanden detektiert werden können.

3.6.1. Der Western Blot

Nach der SDS-PAGE Elektrophorese wurden die Proteine in einer Semidry-Blot-Anlage auf eine Trägermembran transferiert. Anschließend wurden die Proteinbanden mit dem Farbstoff Ponceau S gefärbt und die Trägermembran gescannt. Nach Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Trägermembran durch Milchpulver (1,5%) und BSA (3%), wurden einzelne Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Zunächst wurde die Membran mit einem antigenspezifischen Primärantikörper, der an die Epitope des gesuchten Proteins bindet, inkubiert. Unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden durch mehrfache Spülvorgänge mit TBST von der Membran gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der sich an den Fc-Anteil des Primärantikörpers bindet. Nach 3-maligem Waschen erfolgte die Visualisierung mittels ECL-Kit (GE Healthcare Life Sciences, Germany).

3.6.2. Der Kollagen IV Western Blot

Kollagen IV ist ein wichtiger Bestandteil der Basallamina, der bei zerebraler Ischämie degradiert wird. Mit einem Kollagen IV Western Blot kann die Integrität des mikrovaskulären Systems nachgewiesen werden (Hamann et al., 2002).

Als Primärantikörper wurde Ziegen Anti-Kollagen IV (1:400, Santa Cruz, Biotechnology Inc., USA) und als Sekundärantikörper ein Anti-Goat IgG (1:1.000, GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet.

3.6.3. Der Hämoglobin Western Blot

Durch die Störung der mikrovaskulären Integrität nach Ischämie kommt es zu petechialen Einblutungen in das Gewebe (Hamann et al., 2002). Diese Menge des Hämoglobins im Gehirngewebe kann biochemisch im Western Blot quantifiziert werden und dient als Nachweis für die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Burggraf et al., 2005).

Als Primärantikörper fungierte Kaninchen Anti-Hämoglobin (1:1.000, Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland) als Sekundärantikörper ein Anti-Rabbit (1:1.000, GE Healthcare, München, Deutschland).

3.6.4. Die Zymographien

Nach einer nicht denaturierenden SDS-PAGE Elektrophorese wurden die Gele 1h mit einem Renaturierungspuffer inkubiert, um die Proteine zu reaktivieren. Über Nacht wurde das Gel mit einem Reaktionspuffer versetzt. Nach mindestens 18h Inkubationszeit wurden die Proteine im Gel fixiert und mit Coomassie teil-entfärbt.

3.6.4.1. Die Gelatine Zymographie

Mit der Gelatine Zymographie kann selektiv die Gelatinasenaktivität von MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden. Nach Ischämie steigen diese signifikant an (Burggraf et al., 2003) und zerstören die Basalmembran durch ihre proteolytische Wirkung. Die Gelmatrix enthält Gelatine (0,5%), die als Substrat von den Gelatinasen selektiv abgebaut wird. Am Ende stellen die hellen, entfärbten Banden die Lysezonen dar, also die Areale, an denen die Proteasen aktiv waren und Gelatine verdaut wurde. Diese wurden anschließend mit einem Gelauswertesystem (TINA, Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgerät GmbH, Deutschland) quantifiziert.

3.6.4.2. Die reverse Zymographie

Die reverse Zymographie dient als Nachweis der endogenen MMP Inhibitoren. Diese inhibieren die MMPs, wobei TIMP-2 vor allem MMP-2 und TIMP-1 vor allem MMP-9 blockiert. Die Gelmatrix enthält sowohl aktive MMPs, als auch Gelatine. Da MMPs Gelatine abbauen, zeigen am Ende die gefärbten Banden die Stellen auf, an denen die MMPs durch TIMP blockiert wurde.

3.6.4.3. Die caseinabhängige Plasminogen Zymographie

Mittels der Plasminogen Zymographie kann die Enzymaktivität der endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA quantitativ nachgewiesen werden (Burggraf et al., 2005). T-PA und u-PA aktivieren die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, so dass sich Plasmin vermehrt anreichert. Da Plasmin die Eigenschaft hat das Protein Casein abzubauen, wurde zum Nachweis die Gelmatrix mit Casein versetzt. Am Schluss erscheinen die Zonen heller, die u-PA und t-PA enthalten und an welchen somit Plasmin aktiviert wurde.

3.6.5. Die Proteinbestimmung für Zymographie und Western Blot

Für die quantitative Proteinbestimmungen wurden die Überstände mit PBS 1:25 verdünnt und mit dem Farbstoff „working reagent“ (50 Teile Reagent A und ein Teil Reagent B) inkubiert, welcher mit den Proteinen einen Komplex bildet. Anschließend wurden die Proteine im Photometer bei einem Absorptionsspektrum von 563 nm gemessen (Ultrospec 500pro, Amersham). Zur Eichung diente eine Standardreihe aus BSA.

3.6.6. Die Auswertung der biochemischen Daten

Zur Quantifizierung und Auswertung wurden die Western Blots und Zymographien nach Fertigstellung eingescannt und digitalisiert. Mit Hilfe des Computerauswertprogramms TINA (TINA, Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgerät

GmbH, Deutschland) wurde die optische Dichte der Banden in den ischämischen und nicht-ischämischen Arealen bestimmt und miteinander verglichen.

Zur Eliminierung von Fehlern wurde der Quotient zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre gebildet. Ergab sich ein Quotient von 1, war die Anzahl der Proteine auf beiden Hemisphären gleich. Später wurden die Quotienten untereinander verglichen.

3.7. Statistische Methoden

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Bei jeder Tiergruppe wurde das Verhältnis von ipsilateraler zu kontralateraler Hirnregionen bestimmt. Um Differenzen zwischen den einzelnen Tiergruppen feststellen zu können, wurde ein Student'scher t-Test durchgeführt. Dabei wurde ein Signifikanzlevel von 5% ($p < 0,05$) angesetzt. Die Auswertungen der Werte von der Infarkt volumetrie, Kollagen Typ IV, Hb Extravasation, MMP-2, MMP-9, u-PA und t-PA wurden in der Dosisabhängigkeit einer ANOVA-Analyse (Kruskal-Wallis-Analyse) unterzogen.

3.8. Die Tierschutzgenehmigung

Alle Tierexperimente wurden vor der Durchführung bei der Regierung von Oberbayern eingereicht und genehmigt (Zulassungsnummer: 211-2531/48/98). Sie sind im Einklang mit den geltenden Tierschutzrichtlinien.

4. Ergebnisse

Um den Einfluss von Mikroplasmin auf die Integrität der Basallamina besser untersuchen zu können, wurden verschiedene Parameter des mikrovaskulären Systems und der involvierten Proteasen bei unterschiedlichen Mikroplasminkonzentrationen getestet. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über alle verwendeten Studiengruppen und deren enthaltene Tierzahl wieder. Sobald die Tierzahl innerhalb einer Gruppe abweicht, wird dies im Folgenden explizit erwähnt.

Gruppe	Anzahl (n=)
Kontrolle	8
scheinoperiert	6
0,5mg/KG μ Pli	6
1mg/KG μ Pli	6
2,5mg/KG μ Pli	7
5mg/KG μ Pli	13
10mg/KG μ Pli	15

Tabelle 1: Übersicht aller verwendeten Gruppen mit der jeweiligen Tierzahl.

Bei den scheinoperierten Tieren konnte in keinem der folgenden Versuche ein Einfluss der Operationsprozedur auf die Gehirne festgestellt werden. In allen folgenden Experimenten ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre detektieren (alle $p > 0,05$).

4.1. Die Verhaltensstudien

4.1.1. Der Garcia Test

Der Garcia Test (Garcia et al., 1995) wurde bei allen 61 Tieren vor und nach der Ischämie durchgeführt, um die neurologischen Defizite beurteilen und vergleichen zu können (siehe Tabelle 2). Vor der OP erreichten 46 Tiere die Maximalpunktzahl von 18 Punkten. Bei den übrigen 15 Tieren war der Test nicht auswertbar, da die Tiere einzelne Versuchsetappen verweigert hatten.

Nur die scheinoperierten Tiere erreichten sowohl vor, als auch nach der OP die volle Punktzahl. Alle übrigen Gruppen verschlechterten sich signifikant nach I3R24, wobei der Mittelwert der Gesamtpunktzahl der einzelnen Tiergruppen leicht variierte (alle $p < 0,01$). So ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe (durchschnittlich $12,2 \pm 1,3/18,0$ Punkte) und einigen Tieren der niedrig (1mg Mikroplasmin $14,0 \pm 0,71/18,0$, t-Test $p=0,009$) bis moderat

Ergebnisse

(5mg Mikroplasmin $8,8 \pm 3,9/18,0$, t-Test $p=0,019$) dosierten Mikroplasmingruppen feststellen. Ferner konnte auch innerhalb der unterschiedlichen Mikroplasmingruppen ein signifikanter Unterschied detektiert werden (5mg Mikroplasmin versus 10mg Mikroplasmin, t-Test $p=0,049$). In Tabelle 2 sind die Werte des Garcia Tests bei den einzelnen Gruppen aufgeführt.

Garcia	Anzahl	Punktzahl (nach OP/vor OP)
Kontrolle	8	$12,2 \pm 1,2/18,0$
scheinoperiert	6	$18,0 \pm 0,0/18,0$
0,5mg/KG μ Pli	6	$13,3 \pm 2,4/18,0$
1mg/KG μ Pli	5	$14,0 \pm 0,7/18,0$
2,5mg/KG μ Pli	6	$13,5 \pm 3,4/18,0$
5mg/KG μ Pli	5	$8,8 \pm 3,9/18,0$
10mg/KG μ Pli	10	$12,4 \pm 3,6/18,0$

Tabelle 2: Erreichte Punktzahlen (als Mittelwerte) im Verhaltenstest nach Garcia bei alle Studiengruppen. Die maximal erreichbare Punktzahl war 18. Bis auf die Gruppe der scheinoperierten Tiere verschlechterten sich alle Gruppen nach zerebraler Ischämie.

4.1.2. Der Licking Test

Der Licking Test ist ein neurologischer Verhaltenstest, bei dem die Motorik der Zunge beurteilt wird (Gulyaeva et al., 2003). Der Test wurde sowohl vor, als auch nach der OP durchgeführt, um die prozentuale Abweichung bestimmen zu können. Der Licking Test wurde insgesamt an nur 38 Ratten durchgeführt. Zum einen verringerte sich die Anzahl der Tiere dadurch, dass der Test erst zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt wurde. Darüber hinaus kristallisierten sich erschwerte Testbedingungen heraus, da einige Tiere nach der Operation die Erdnussbutter verweigerten und somit kein Testergebnis erzielt werden konnte. Die Ausgangswerte waren für jedes Tier individuell und spezifisch. Wegen der geringen Gesamtanzahl wurden die Tiere zu zwei dosisabhängigen Gruppen zusammengefasst (siehe Tabelle 3 im Anhang und Abbildung 14). Die niedrig dosierte Mikroplasmingruppe ($G_{0,5-1mg}$) setzte sich aus Tieren der 0,5mg Mikroplasmin- und der 1mg Mikroplasmingruppe zusammen. Die moderat- bis hochdosierte Mikroplasmingruppe ($G_{2,5-5-10mg}$) umfasste die 2,5mg, 5mg und 10mg Mikroplasmintiere.

Die unbehandelte Kontrollgruppe erreichte einen Endwert von $21,9 \pm 14,4\%$ Eindringtiefe vom Ausgangswert. Die Performance der Tiere konnte durch die dosisabhängige Mikroplasmingabe verbessert werden. Eine signifikante ($p=0,037$) Verbesserung mit 52,5% vom Ausgangswert konnte die moderat- bis hochdosierte Gruppe $G_{2,5-5-10mg}$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erzielen. Die niedrig

dosierte Mikroplasmengruppe $G_{0,5-1\text{mg}}$ zeigte dagegen einen geringeren positiven Effekt von $24,1 \pm 8,9\%$ vom Ausgangswert (nicht signifikant). Es wurde ferner ein dosisabhängiger Effekt detektiert: die moderat- bis hochdosierte Mikroplasmengruppe $G_{2,5-5-10\text{mg}}$ unterschied sich signifikant ($p < 0,02$) von der niedrig dosierten Mikroplasmengruppen $G_{0,5-1\text{mg}}$ (siehe Tabelle 3 im Anhang).

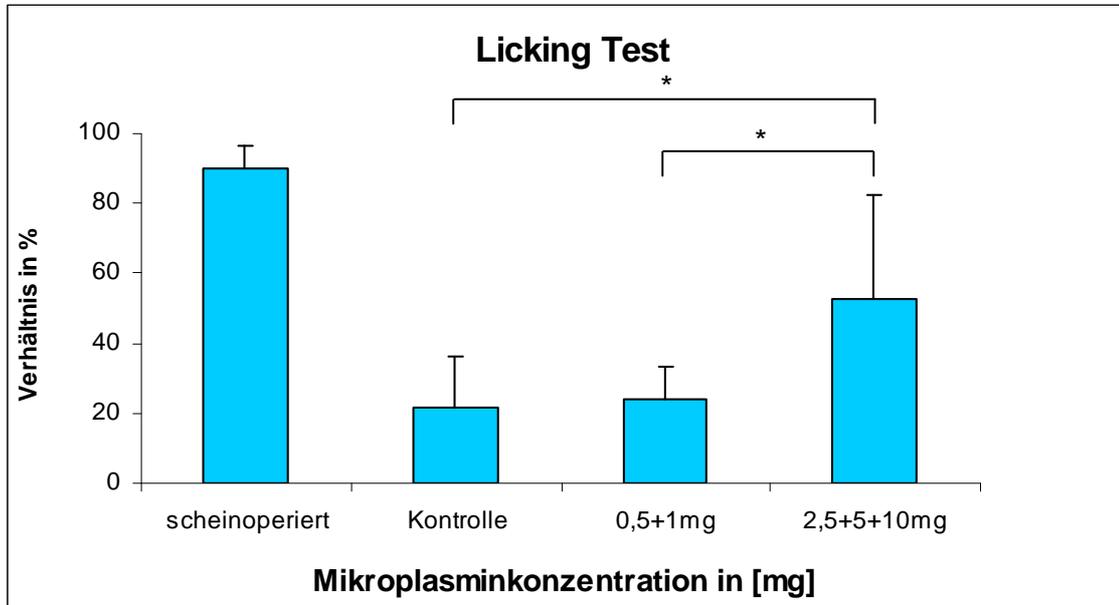


Abbildung 14: Prozentuale Abweichung nach zerebraler Ischämie beim Licking Test. Vergleich von niedrig dosiertem, moderat- bis hochdosiertem Mikroplasma und der Kontrollgruppe. Es zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,02$) Unterschied innerhalb der beiden Mikroplasmengruppen. Auch die moderat- bis hochdosierte Mikroplasmengruppe unterschied sich von der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,037$). Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar. *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.2. Das Infarktvolumen

Mit Hilfe der Infarktvolumetrie kann man nach MCA-Okklusion das Infarktvolumen berechnen (siehe Abbildung 15A).

Durch die Behandlung mit Mikroplasma konnte das Infarktvolumen reduziert werden (siehe Tabelle 4 im Anhang). Das Infarktvolumen eines unbehandelten Tieres betrug nach Ischämie/Reperfusion durchschnittlich $167,3 \pm 13,2 \text{ mm}^3$. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied (ANOVA $p < 0,001$) im Verlauf der einzelnen Mikroplasmindosen (siehe Abbildung 15B). Das Infarktvolumen verringerte sich signifikant mit steigenden Mikroplasmindosen. Das kleinste Infarktvolumen ($51,0 \pm 22,6 \text{ mm}^3$) konnte mit der höchsten Dosis (10mg Mikroplasma) erzielt werden. Hierbei konnten signifikante Unterschiede im Infarktvolumen zwischen den Kontroll- und den höher dosierten Mikroplasmintieren (10mg: t-Test $p < 0,017$; 5mg: t-Test $p < 0,038$; 2,5mg: t-Test $p < 0,036$) detektiert werden.

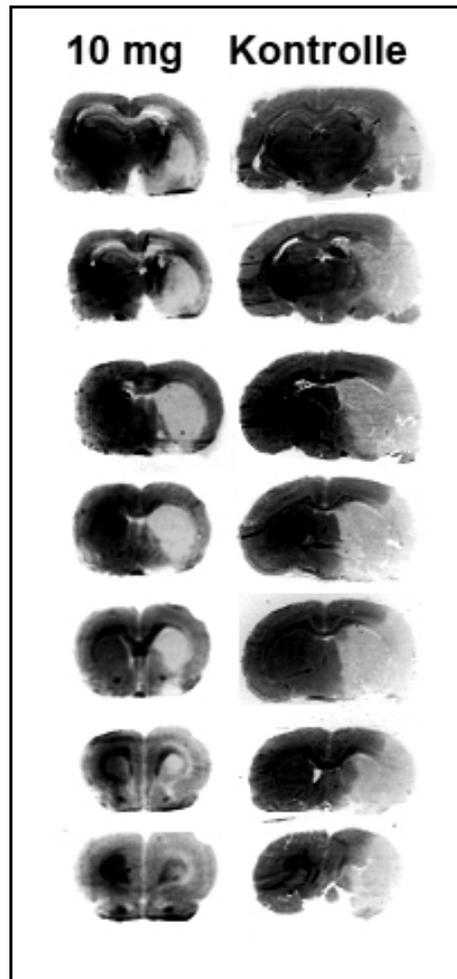


Abbildung 15A: Darstellung repräsentativer Nissl gefärbter Hirnschnitte eines Kontroll- und eines 10mg Mikroplasmin-tiers. Die Schnitte haben jeweils einen Abstand von 1 mm. Die entfärbten Bereiche (hellgraue Zonen) zeigen die ischämischen Areale auf.

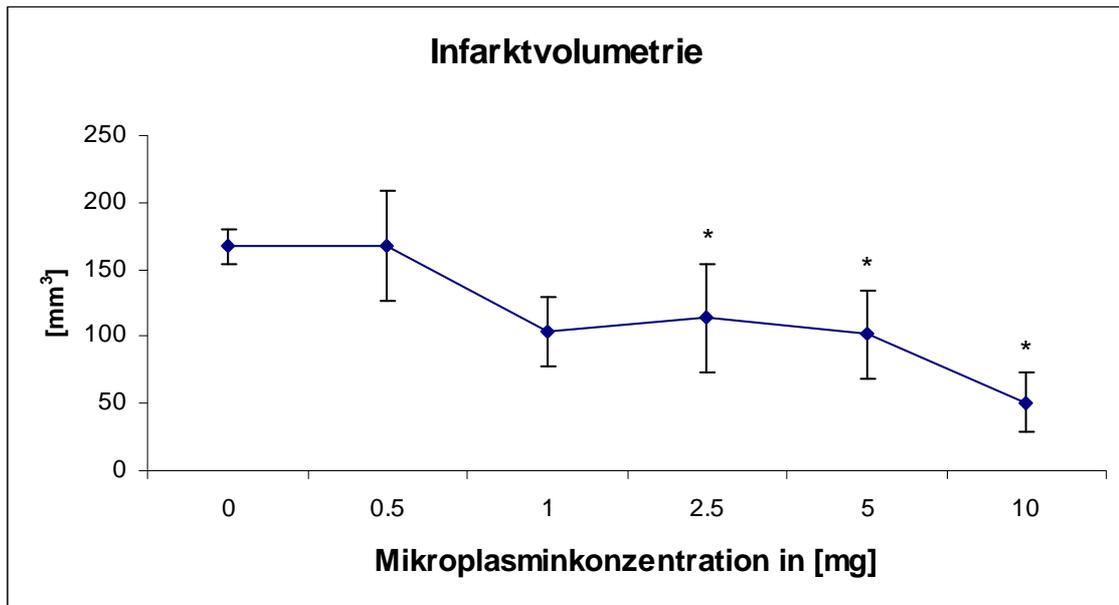


Abbildung 15B: Graphische Darstellung des Infarktmetrie. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall (ANOVA $p < 0,001$) des Infarktmetrie mit steigender Mikroplasmindosis. Der größte Unterschied konnte zwischen der Kontroll- und 10mg Mikroplasmingruppe (t-Test $p < 0,017$) detektiert werden. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.3. Die Gefäßzahl und die Gefäßdichte

Einer der Hauptbestandteile der Basallamina ist das Kollagen IV. Um das Ausmaß der Schädigung der Basalmembran bestimmen zu können, wurde der Kollagen IV Gehalt der Mikrogefäße quantifiziert.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Auswertung wurde zum einen die Anzahl der Mikrogefäße (Gefäßzahl), zum anderen die Dichte der zerebralen Mikrogefäße (Gefäßdichte), sowohl im Kortex (Kx), als auch in den Basalganglien (BG) berechnet. Hierbei wurden die Werte in Relation von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre bestimmt und angegeben. Die Scheinoperation hatte weder auf die Gefäßzahl noch auf die Gefäßdichte einen Einfluss.

Zunächst wird der Einfluss von Mikroplasma auf die Gefäßzahl (siehe Tabelle 5A) näher erläutert. Die Gefäßzahl betrug bei den unbehandelten Kontrolltieren im ischämischen Kortex $88 \pm 3\%$ der nicht-ischämischen Hemisphäre. In den Basalganglien war ein größerer Verlust von nur $83 \pm 7\%$ detektierbar. Bei den Mikroplasma behandelten Tieren zeigte sich die größte Abnahme des Kollagen IV Gehalts bei der 1mg Gruppe (Kx: $79 \pm 6\%$; BG: $77 \pm 4\%$). Mit der 5mg Mikroplasmindosis konnte der geringste Verlust (Kx: $97 \pm 4\%$, t-Test $p = n.s.$; BG: $100 \pm 10\%$, t-Test $p < 0,006$) von Kollagen IV beobachtet werden. Es konnte allerdings kein signifikanter dosisabhängiger Verlauf der unterschiedlichen Mikroplasminkonzentrationen detektiert werden.

Ergebnisse

Gefäßzahl	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	88 ± 3%		83 ± 7%	
scheinoperiert	102 ± 4%	0,036	101 ± 2%	<0,001
0,5mg/KG μ Pli	84 ± 6%	n.s.	87 ± 6%	n.s.
1mg/KG μ Pli	79 ± 6%	n.s.	77 ± 4%	n.s.
2,5mg/KG μ Pli	90 ± 7%	n.s.	101 ± 11%	0,015
5mg/KG μ Pli	97 ± 4%	n.s.	100 ± 10%	0,006
10mg/KG μ Pli	94 ± 5%	n.s.	88 ± 6%	n.s.

Tabelle 5A: Gefäßzahlen der verschiedenen Studiengruppen im Kortex und den Basalganglien. Die Werte sind als Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Seite angegeben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren (Kx: 88 ± 3%, BG: 83 ± 7%) und (1) den scheinoperierten Tieren (Kx: 102 ± 4%, t-Test $p=0,036$; BG: 101 ± 2%, t-Test $p<0,001$), (2) den 2,5mg Mikroplasmintieren (BG: 101 ± 11%, t-Test $p=0,015$) und (3) den 5mg Mikroplasmintieren (BG: 100 ± 10%, t-Test $p=0,006$) gezeigt werden. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwert ± Standardfehler.

Im Folgenden wird näher auf den Einfluss von Mikroplasmin auf die Gefäßdichte (siehe Tabelle 5B) eingegangen. Alle unterschiedlichen Mikroplasminkonzentrationen hatten zwar einen protektiven Einfluss auf die Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kx: 86 ± 3%; BG: 75 ± 2%), es ließ aber dennoch kein Unterschied in den verschiedenen Mikroplasminkonzentrationen (nicht signifikant) detektieren. Die besten Resultate konnten im Kortex die 1mg Mikroplasmin- (101 ± 7%) und die 10mg Mikroplasmingruppe (96 ± 4%) erzielen. Der beobachtete mikrovaskuläre Schutzeffekt war nicht signifikant. In den Basalganglien reduzierte die 5mg Mikroplasmingruppe (108 ± 9%, t-Test $p<0,002$) die Gefäßdichte am wenigsten. Insgesamt war der Verlust der Gefäßdichte in allen Gruppen im Kortex und den Basalganglien annähernd gleich.

Gefäßdichte	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	86 ± 3%		75 ± 2%	
scheinoperiert	100 ± 3%	n.s.	99 ± 2%	0,007
0,5mg/KG µPli	88 ± 7%	n.s.	90 ± 9%	n.s.
1mg/KG µPli	101 ± 7%	n.s.	90 ± 4%	0,016
2,5mg/KG µPli	96 ± 13%	n.s.	104 ± 14%	0,023
5mg/KG µPli	95 ± 6%	n.s.	108 ± 9%	0,002
10mg/KG µPli	96 ± 4%	n.s.	87 ± 4%	0,032

Tabelle 3B: Gemessene Gefäßdichten aller Gruppen im Kortex und den Basalganglien. Es zeigten sich signifikanten Unterschiede in den Basalganglien zwischen der Kontrollgruppe versus Mikroplasmin (scheinoperierte Tiere: 99 ± 2%, t-Test $p=0,007$; 1mg: 90 ± 4%, t-Test $p=0,016$; 2,5mg: 104 ± 14%, t-Test $p=0,023$; 5mg: 108 ± 9%, t-Test $p=0,002$; 10mg: 87 ± 4%, t-Test $p=0,032$). Die angegebenen Werte sind Mittelwert ± Standardfehler, die sich aus dem Verhältnis ischämisch zu nicht-ischämischer Hemisphäre ergeben.

4.4. Das Kollagen Typ IV

Zur weiteren Quantifizierung der Degradation von Kollagen Typ IV wurde ein Western Blot durchgeführt.

In der WB-Analyse konnte eine deutliche Degradierung von Kollagen Typ IV (siehe Tabelle 6 im Anhang und Abbildung 16) bei den unbehandelten Kontrolltieren gegenüber der scheinoperierten Gruppe (Kx: 69 ± 4%; BG: 46 ± 5%; $p<0,001$) festgestellt werden.

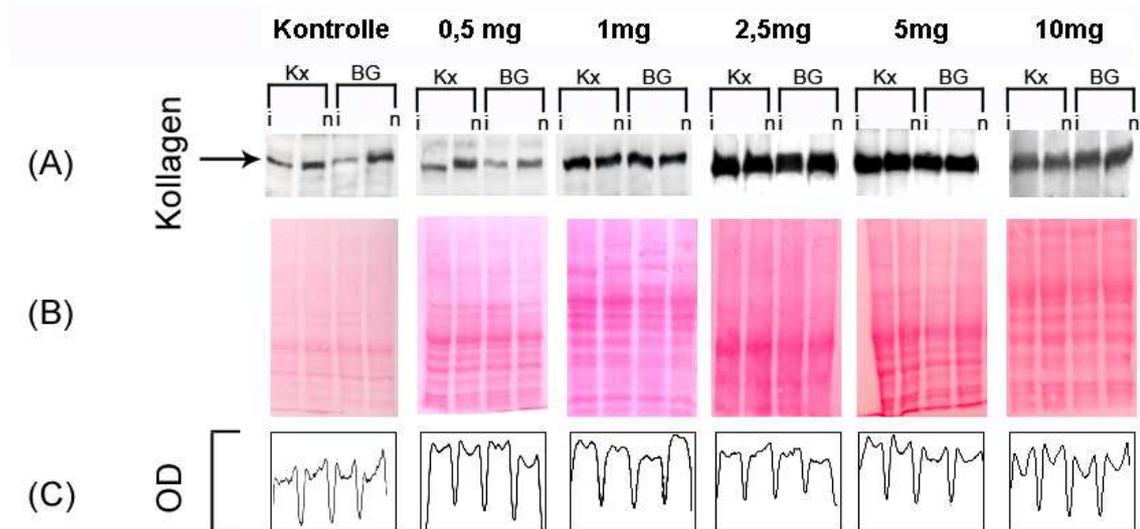


Abbildung 16: Kollagen Typ IV Blot der verschiedenen Studiengruppen nach Ischämie/Reperfusion. (A): Exemplarische Western Blots aller Studiengruppen. Es wurde zwischen ischämischem und nicht-ischämischem Kortex, bzw. Basalganglien unterschieden. (B): Ponceau S-Färbung der Trägermembran vor der Immunreaktion zeigt die aufgetrennten Gesamtproteine. (C): Profil der optischen Dichte (OD) der Gesamtproteine.

Es zeigte sich, dass mit steigenden Mikroplasmindosen (von 1mg bis 10mg) der Kollagen Typ IV Verlust signifikant (ANOVA $p < 0,001$) fällt, d.h. der Kollagen Gehalt steigt. Bei der geringen Dosis von nur 0,5mg Mikroplasmin wurde kein signifikanter Schutz hinsichtlich der Kollagen Typ IV Gehaltes im Kortex $74 \pm 11\%$ festgestellt (siehe Abbildung 17).

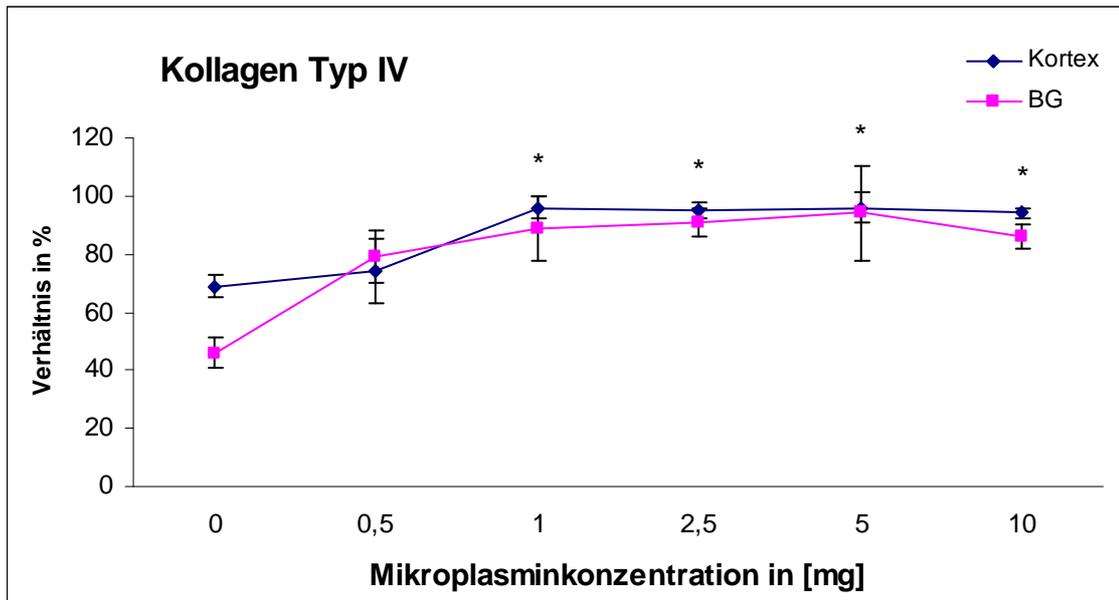


Abbildung 17: Darstellung der Abnahme des Kollagen Typ IV Gehalts in der Kontroll- und den Mikroplasmingruppen im Kortex und den Basalganglien. Die Werte sind als Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hirnhälfte angegeben. Mit steigender Mikroplasmindosis konnte der Verlust von Kollagen Typ IV reduziert werden. Die Werte sind Mittelwert \pm Standardfehler ($p < 0,001$ ANOVA).
*: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.5. Die Hämoglobin Extravasation

Ischämie und Reperfusion schädigen die zerebralen Mikrogefäße, so dass Blut in das Gewebe eindringen kann. Die Hämoglobin Extravasation in dieser Arbeit ist Ausdruck der Schädigung der Integrität der Basallamina. Um sicher zu gehen, dass kein in den Gefäßen verbliebenes Blut die Ergebnisse verfälscht, erfolgte nach jeder Operation eine lange Perfusionszeit (siehe Kapitel Material und Methoden).

Die Western Blot Analyse (siehe Abbildung 18) zeigte bei den unbehandelten Kontrolltieren eine vermehrte Hämoglobin Extravasation auf der ischämischen Kortexseite ($191 \pm 44\%$) und in den ischämischen Basalganglien ($442 \pm 124\%$). Die Scheinoperation führte bei keinem der Tiere zu einer Erhöhung der Hämoglobin Extravasation.

Mit steigenden Mikroplasmindosen konnte die Hämoglobin Extravasation signifikant (ANOVA $p < 0,001$) verringert werden (siehe Tabelle 6 im Anhang und Abbildung 19). Es zeigte sich ein dosisabhängiger Verlauf, wobei mit der kleinsten Mikroplasmindosis (0,5mg) die höchste Hämoglobin Extravasation (Kx: $311 \pm 53\%$; BG: $286 \pm 49\%$) detektiert werden konnte. Das beste Resultat und die geringste Hämoglobin

Ergebnisse

Extravasation (Kx: $125 \pm 5\%$, t-Test $p < 0,05$; BG: $154 \pm 24\%$, t-Test $p < 0,05$) konnte mit der höchsten Dosis (10mg Mikroplasmin) erzielt werden. Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass mit ansteigenden Mikroplasmindosen eine Reduktion der Hämoglobin Extravasation, also der Blutung in das Gewebe, erzielt werden konnte.

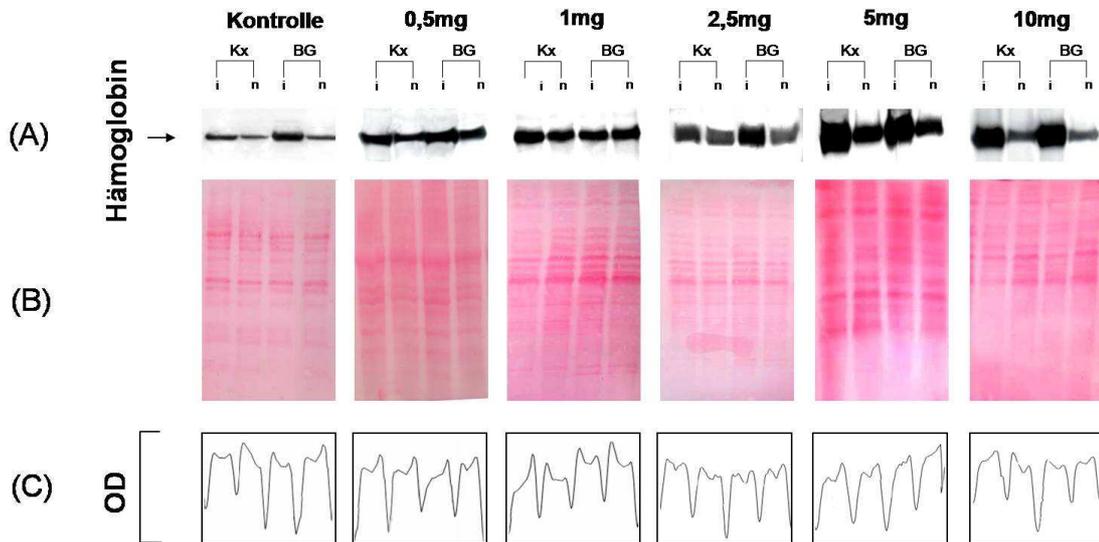


Abbildung 18: Extravasation von Hämoglobin aller Studiengruppen.

(A): Hämoglobin Western Blots. Es wurde zwischen ischämischem und nicht-ischämischen Kortex, bzw. Basalganglien unterschieden. Es wurde je Gruppe ein exemplarisches Gel abgebildet.

(B): Ponceau S-Färbung der Trägermembran vor der Immunreaktion zeigt die aufgetrennten Gesamtproteine.

(C): Profil der optischen Dichte (OD) der Gesamtproteine.

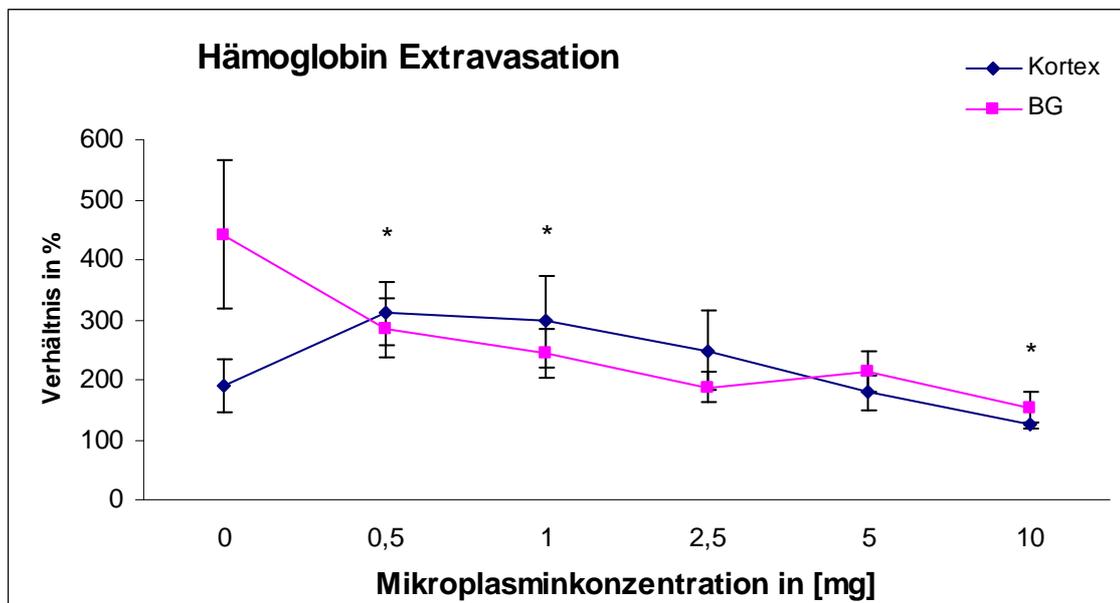


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Hämoglobin Extravasation aller Studiengruppen im Kortex und den Basalganglien. Mit steigender Mikroplasmindosis kommt es sowohl im Kortex, als auch in den Basalganglien zu einer signifikanten Reduktion (ANOVA $p < 0,001$) der Extravasation von Hämoglobin. Die Werte ergeben sich aus den Ergebnissen des Western Blots und sind das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre und stellen den Mittelwert \pm Standardfehler dar. *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.6. Das MMP-2 und MMP-9

MMP-2 und MMP-9 bauen Bestandteile der Basalmembran, wie Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin ab und schädigen somit die Integrität der Basallamina. Mit Hilfe der Gelatine abhängigen MMP Zymographien (siehe Abbildung 20) wurden die Konzentrationen von MMP-2 und -9 im Gehirnlisat bestimmt.

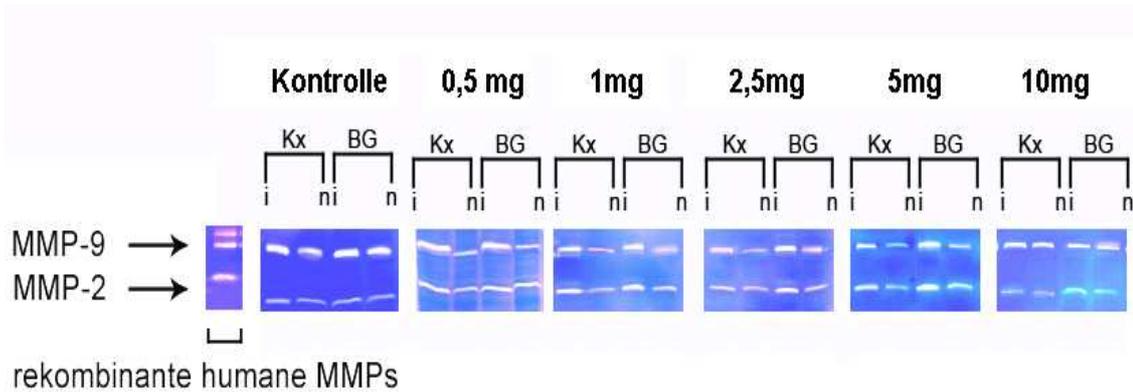


Abbildung 20: Gelatine Zymographien die MMP-2 und MMP-9 zeigen. Repräsentatives Zymogramm von ischämischem und nicht-ischämischem Kortex, bzw. Basalganglien. Als Positivkontrolle dienen die rekombinaten humanen MMPs, MMP-2 und MMP-9, (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die Lysezonen zeigen MMP-Aktivität.

Zunächst wurde der Einfluss von Mikroplasma auf die MMP-2 Konzentration untersucht. Es zeigte sich, dass mit steigender Mikroplasminosis der Einfluss auf die MMP-2 Aktivität sowohl im Kortex, als auch in den Basalganglien signifikant abnahm (ANOVA $p < 0,001$) (siehe Tabelle 8A im Anhang und Abbildung 21). So konnte mit der kleinsten Mikroplasminosis (0,5mg) die größte MMP-2 Aktivität von $238 \pm 98\%$ (t-Test $p < 0,062$ versus Kontrollgruppe) im Kortex und $422 \pm 129\%$ (t-Test $p < 0,002$ versus Kontrollgruppe) in den Basalganglien festgestellt werden. Die höchste Mikroplasminosis (10mg) hatte fast keinen Einfluss auf die MMP-2 Aktivität (Kx: $111 \pm 10\%$, t-Test $p = n.s.$; BG: $107 \pm 1\%$, t-Test $p = n.s.$).

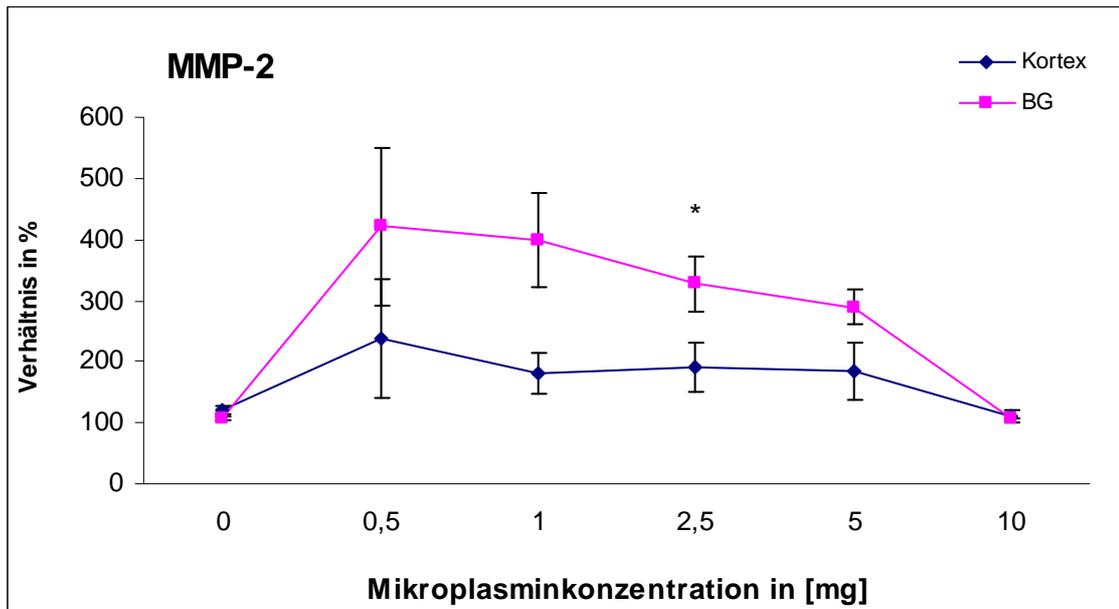


Abbildung 21: Relative Werte für MMP-2 jeweils für den Kortex und die Basalganglien. Die Werte wurden aus dem Verhältnis von ischämischer zu nicht ischämischer Kontrollseite berechnet und stellen Mittelwert \pm Standardfehler dar (ANOVA $p < 0,001$). *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

Auch bei der Untersuchung des Einflusses von Mikroplasmin auf die MMP-9 Konzentration konnte gezeigt werden, dass sich mit steigender Mikroplasmindosis die MMP-9 Aktivität signifikant im Kortex (ANOVA $p < 0,008$) und den Basalganglien (ANOVA $p < 0,001$) reduzierte (siehe Tabelle 8B im Anhang und Abbildung 22). Die maximale MMP-9 Aktivität (Kx: $806 \pm 152\%$; BG: $817 \pm 217\%$) wurde mit der kleinsten Mikroplasmindosis (0,5mg) erzielt. Die höchste Mikroplasminkonzentration (10mg) zeigte keine Veränderung des MMP Gehalts versus Kontrollgruppe.

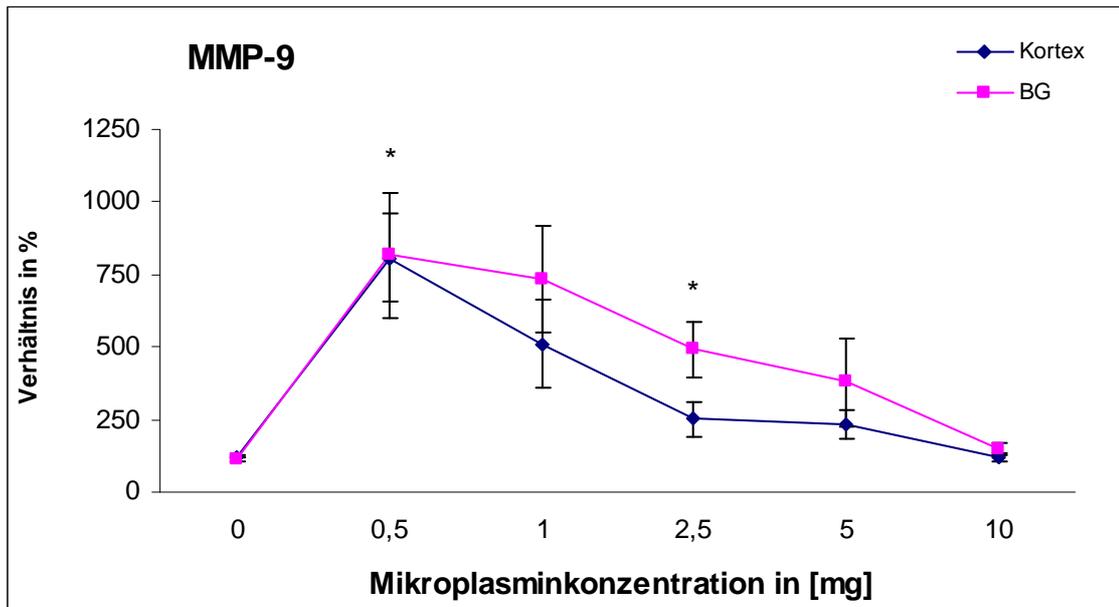


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Werte für MMP-9 jeweils für den Kortex und die Basalganglien. Die Werte wurden aus dem Verhältnis von ischämischer zu nicht ischämischer Kontrollseite berechnet und stellen Mittelwert \pm Standardfehler dar (ANOVA $p < 0,001$). *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.7. Die endogenen Inhibitoren TIMP-2 und TIMP-1

Die endogenen MMP-Inhibitoren, die TIMPs, wirken insofern protektiv, indem sie dem Abbau der Basallamina durch die Inhibierung der schädlichen Proteasen entgegenwirken. Dabei wird MMP-2 v.a. durch TIMP-2 und MMP-9 vornehmlich durch TIMP-1 inhibiert. Während fokaler zerebraler Ischämie kommt es physiologisch nicht nur zur Hochregulation der Proteasen, sondern auch der Inhibitoren. Es wird vermutet, dass der Körper durch die gleichzeitige Erhöhung der TIMPs versucht die MMPs zu neutralisieren, um den Schaden auf die BL begrenzen zu können. Die TIMPs wurden mit Hilfe der reversen Zymographie dargestellt (siehe Abbildung 23).

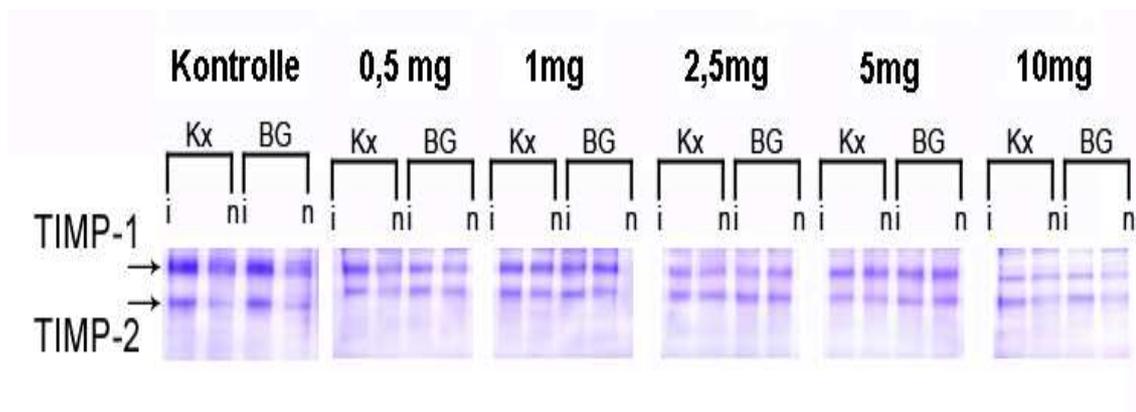


Abbildung 23: Reverse Zymographie der MMP Inhibitoren TIMP-2 und TIMP-1. Es wurden ischämischer und nicht-ischämischer Kortex, bzw. Basalganglien unterschieden. In dem repräsentativen Zymogramm zeigen die gefärbten Banden die Areale auf, in denen MMP durch TIMP blockiert wurde und somit nicht lytisch aktiv sein konnte.

Ergebnisse

Zunächst wurde der TIMP-2 Gehalt nach fokaler zerebraler Ischämie untersucht. So konnte mit Hilfe der reversen Zymographie (siehe Abbildung 24) festgestellt werden, dass die Kontrollgruppe sowohl im Kortex ($169 \pm 4\%$), als auch in den Basalganglien ($154 \pm 22\%$) einen größeren Anstieg des TIMP-2 Gehalts im Vergleich zu den unterschiedlichen Mikroplasmingruppen zeigte (siehe Tabelle 9A im Anhang und Abbildung 23A). Signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrolltieren und den Mikroplasmintieren ließen sich nur im Kortex bei den 2,5mg ($77 \pm 5\%$, t-Test $p < 0,047$) und den 5mg ($83 \pm 6\%$, t-Test $p < 0,040$) detektieren. Die übrigen Mikroplasminkonzentrationen zeigten keinen signifikanten Anstieg des TIMP Gehalts.

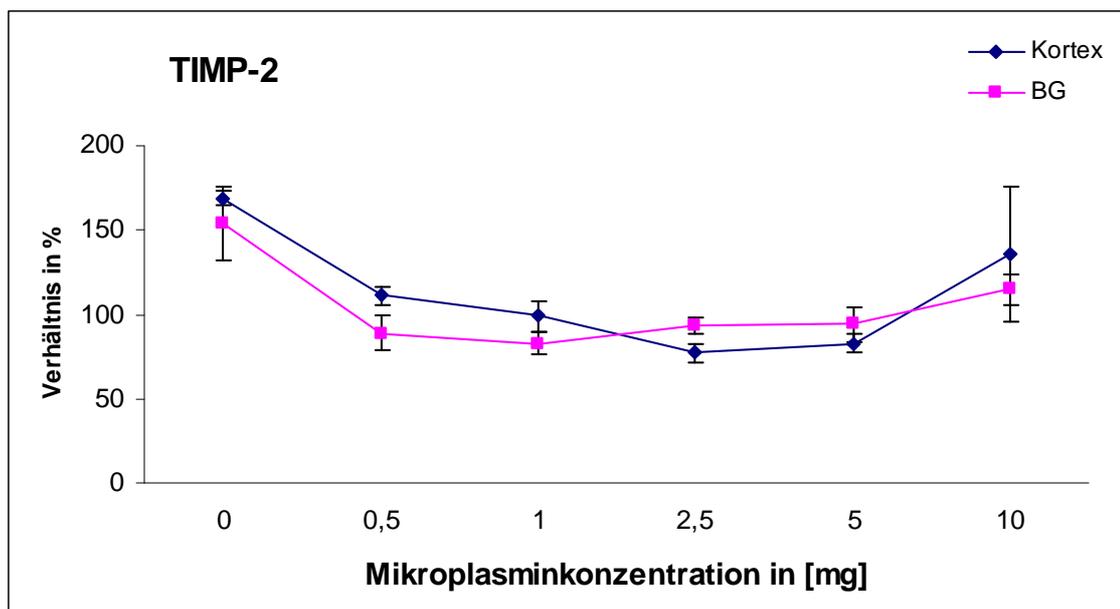


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Werte für den endogenen Inhibitor TIMP-2 für den Kortex und die Basalganglien. Die Werte berechnen sich aus dem Verhältnis ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre und stellen Mittelwert \pm Standardfehler dar.

Der stärkste Anstieg an TIMP-1 wurde in der unbehandelten Kontrollgruppe sowohl im ischämischen Kortex ($151 \pm 23\%$), als auch in den ischämischen Basalganglien ($163 \pm 19\%$), verglichen mit der nicht-ischämischen Kontrollseite, gezeigt (siehe Tabelle 9B im Anhang und Abbildung 23B). Bei den niedrig bis moderat dosierten Mikroplasmindosen (0,5-5mg) ließ sich jeweils ein Anstieg des TIMP-1 Gehalts feststellen. Nur die hohe Mikroplasminkonzentration (10mg) zeigte keine signifikante Hochregulation von TIMP-1 im Vergleich zur Kontrolle.

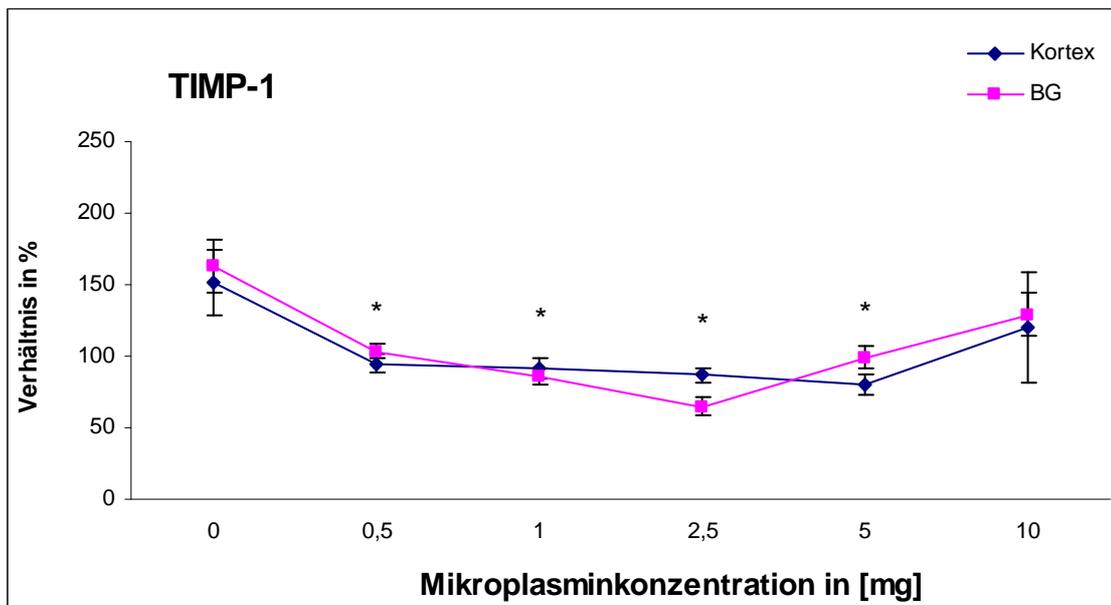


Abbildung 25: Graphische Darstellung des endogenen MMP Inhibitoren TIMP-1 für Kortex und Basalganglien. Die Werte berechnen sich aus dem Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre und sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.8. Das Verhältnis Inhibitor zu Protease TIMP-2/MMP-2 und TIMP-1/MMP-9

Im physiologischen Zustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen den endogenen MMP Inhibitoren TIMP-2 bzw. TIMP-1 und den Proteasen MMP-2 bzw. MMP-9. Nach zerebraler Ischämie kommt es sowohl zur Hochregulierung von MMP, als auch zum Anstieg der TIMPs. Ob die Basallamina geschützt oder abgebaut wird, entscheidet unter anderem das Verhältnis von Inhibitor/Protease. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Inhibitoren sollte die Basallamina vor dem Abbau durch die Proteasen schützen.

Es wurde daher das rechnerische Verhältnis von TIMP zu MMP gebildet, um das Überwiegen des Inhibitor, bzw. der Protease näher beschreiben zu können. Ist der Quotient größer als 1, verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Inhibitoren.

Bei der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich sowohl im Kortex (TIMP-2/MMP-2: $1,0 \pm 0,1$; TIMP-1/MMP-9: $1,2 \pm 0,1$), als auch in den Basalganglien (TIMP-2/MMP-2: $1,6 \pm 0,1$, TIMP-1/MMP-9: $1,4 \pm 0,2$) eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Inhibitoren.

Zunächst wurde der Einfluss von Mikroplasma auf das Verhältnis von TIMP-2/MMP-2 näher untersucht (siehe Tabelle 10A im Anhang und Abbildung 26). Nach der Ischämie/Reperfusion zeigte sich mit steigender Mikroplasminindosis eine tendenzielle Verschiebung des TIMP/MMP-Verhältnisses in Richtung der Inhibitoren. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Inhibitoren konnte dennoch nur mit der höchsten Mikroplasminindosis (10mg) im Kortex (TIMP-2/MMP-2: $1,0 \pm 0,1$) erreicht werden, wobei kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand.

Ergebnisse

In den Basalganglien zeigte sich unter der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) eine signifikante Verschiebung der Ratio Inhibitoren/Proteasen (TIMP-2/MMP-2: $1,1 \pm 0,1$; t-Test $p < 0,024$ versus Kontrollgruppe) in Richtung der Inhibitoren. Bei den niedrig bis moderat dosierten Mikroplasminkonzentrationen (0,5-5mg) lag der Quotient, sowohl im Kortex, als auch in den Basalganglien, stets unter 1, also auf Seiten der Proteasen.

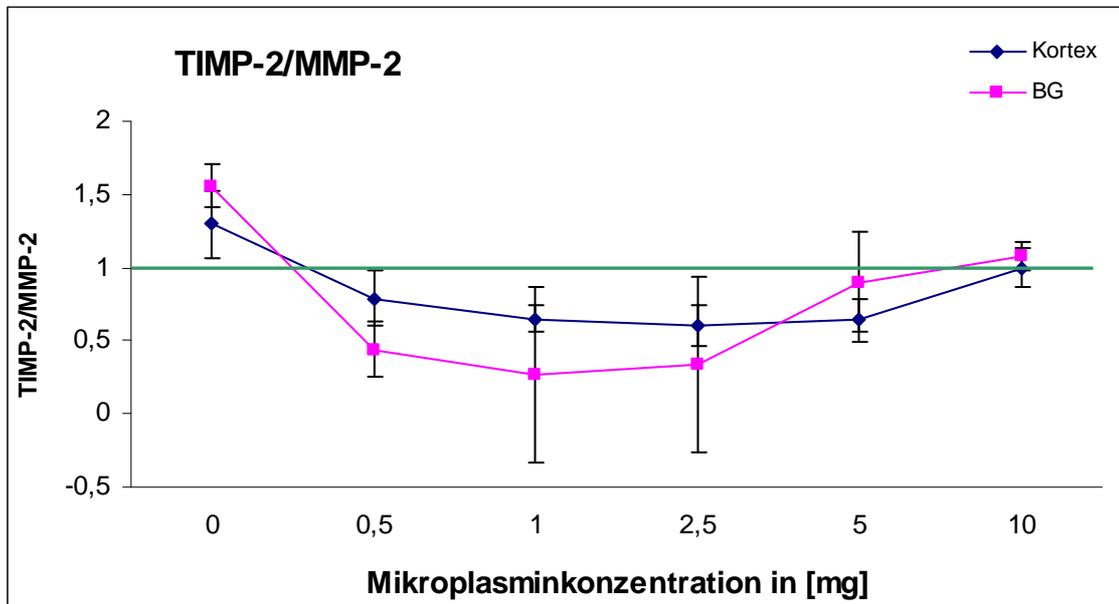


Abbildung 26: Darstellung des Verhältnisses von TIMP-2/MMP-2. Ist der Quotient >1 , liegt das Verhältnis auf Seiten des Inhibitors TIMP-2, ist der Quotient <1 auf Seiten der Protease MMP-2.

Bei der Untersuchung des TIMP-1/MMP-9 Verhältnisses (Tabelle 10B im Anhang und Abbildung 27) zeigte sich ebenfalls nur bei der hochdosierten Mikroplasminkonzentration (10mg) die Andeutung einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Inhibitoren (Kx: $1,02 \pm 0,16$, t-Test $p = n.s.$; BG: $1,05 \pm 0,05$, t-Test $p = n.s.$). Bei den niedrig bis moderat dosierten Mikroplasminkonzentrationen ließ sich, sowohl im Kortex, als auch in den Basalganglien, mit steigender Dosis eine zunehmende Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Inhibitoren feststellen, wobei das Verhältnis stets auf Seiten der Proteasen lag.

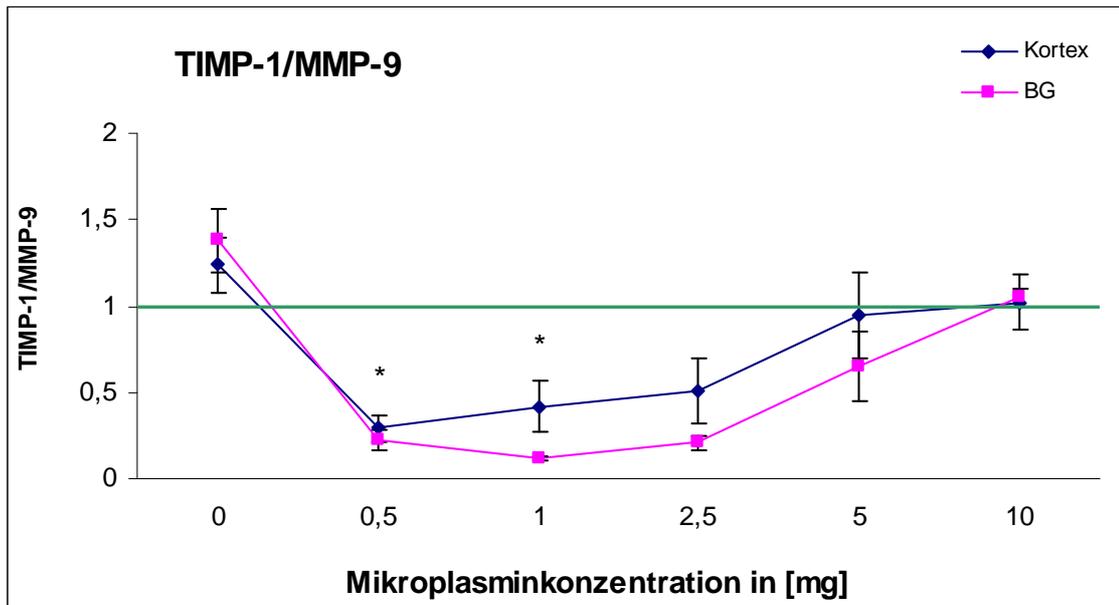


Abbildung 27: Graphische Abbildung des Inhibitor/Protease Verhältnisses von TIMP-1/MMP-9 im Kortex und in den Basalganglien aller Studiengruppen. Die Werte sind als Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre angegeben und stellen Mittelwert \pm Standardfehler dar. *: $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe.

4.9. Die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA

Die endogenen Plasminogenaktivatoren u-PA und t-PA wirken auf die Schädigung der Basallamina (1) direkt als Proteasen und (2) indirekt, indem sie als Aktivatoren die Umwandlung von Plasminogen in die Protease Plasmin katalysieren. Mit Hilfe der Casein-abhängigen-Plasminogen-Zymographie können sie im Gehirngewebe nachgewiesen und auch quantifiziert werden (siehe Abbildung 28).

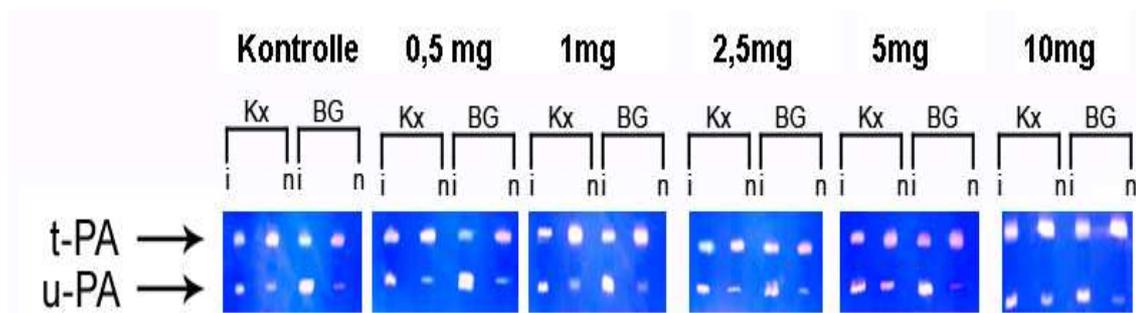


Abbildung 28: Casein-abhängige-Plasminogen-Zymographie der Plasminogen-Aktivatoren t-PA und u-PA. Es wurden ischämischer und nicht-ischämischer Kortex, bzw. Basalganglien getrennt untersucht und dargestellt. In dem Zymogramm wurden die zwei Lysezonen detektiert: t-PA (Molekulargewicht 64kDa) und u-PA (Molekulargewicht 46kDa).

Nach MCA-Okklusion veränderte sich bei der Kontrollgruppe die t-PA Aktivität (Kx: $104 \pm 8\%$; BG: 102 ± 125) nicht. Die u-PA Aktivität (Kx: $171 \pm 20\%$; BG: $1019 \pm 226\%$) wurde in der Kontrollgruppe stark hochreguliert.

Zunächst wurde die t-PA Aktivität näher untersucht (siehe Tabelle 11A im Anhang und Abbildung 29). So konnte gezeigt werden, dass keine der Mikroplasmingruppen einen

Ergebnisse

Einfluss auf die Hochregulierung der t-PA Aktivität im Kortex oder den Basalganglien hatte. Es konnten anähernd gleiche Werte der t-PA Aktivität in der Kontrollgruppe (Kx: $104 \pm 8\%$; BG: $102 \pm 12\%$) und in der hoch dosierten 10mg Mikroplasmingruppe (Kx: $103 \pm 6\%$; BG: $93 \pm 6\%$, t-Test: $p=n.s.$) detektiert werden. Nur im Kortex der 2,5mg Mikroplasmingruppe ($73 \pm 14\%$, t-Test: $p<0,019$) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der t-PA Aktivität festgestellt werden.

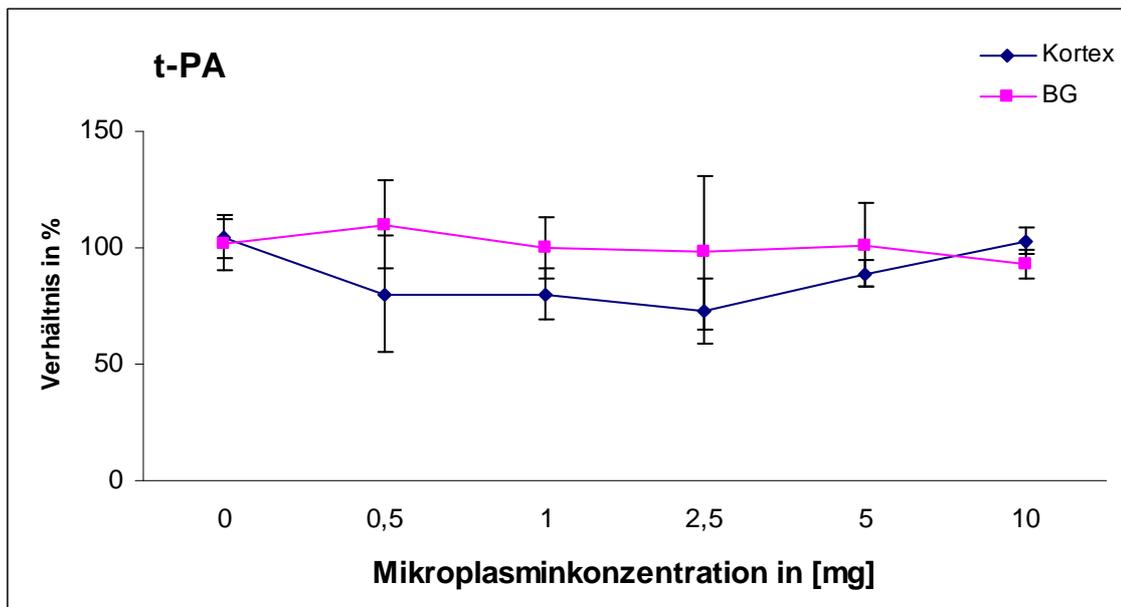


Abbildung 29: Graphische Darstellung der t-PA Aktivität im Kortex und den Basalganglien. So zeigt sich, dass keine der Mikroplasminkonzentrationen zu einer Hochregulierung der t-PA Aktivität führte. Die Werte ergeben sich aus dem Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Kontrollseite und sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Bei der Analyse der endogene u-PA Aktivität (siehe Tabelle 11B im Anhang und Abbildung 30) konnte festgestellt werden, dass alle Mikroplasmindosen die u-PA Aktivität in den Basalganglien nicht beeinflussen konnten. Im Kortex führten die niedrig bis moderat dosierten Mikroplasmingruppen (0,5-5mg) zu einer Erhöhung der u-PA Aktivität. Nur die höchste Mikroplasmindosis (10mg) führte im Kortex zu keiner Hochregulierung der u-PA Aktivität ($159 \pm 42\%$, t-Test $p=n.s.$ versus Kontrollgruppe).

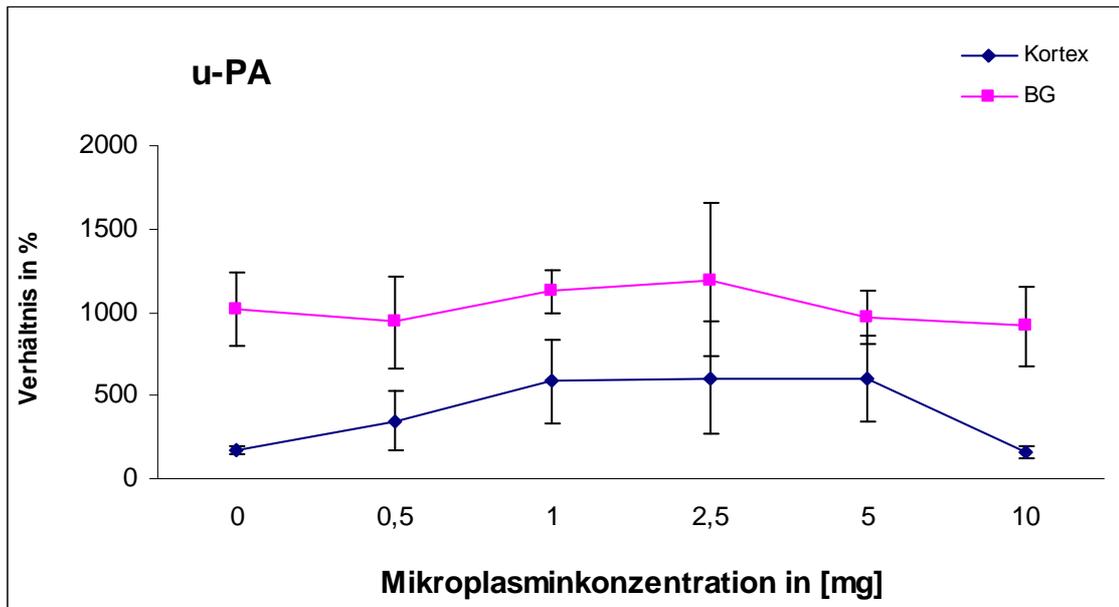


Abbildung 30: Graphische Darstellung des Plasminogen-Aktivators u-PA im Kortex und den Basalganglien aller Studiengruppen. Die relativen Werte ergeben sich aus dem Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Kontrollseite und sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des neuen Thrombolytikums Mikroplasmin auf die Entwicklung eines zerebralen Infarktes und insbesondere auf die Integrität der Basallamina nach dreistündiger fokaler zerebraler Ischämie und 24-stündiger Reperusionszeit in einem Rattenmodell untersucht.

Der Verlust der Integrität der Basallamina während und nach zerebraler fokaler Ischämie zeigt sich neben der ödematösen Schwellung v.a. in der Extravasation von Bluteilchen (Hamann et al., 1996).

Bei den Untersuchungen wurde festgestellt, dass Mikroplasmin den Neuroscore der post-ischämisch durchgeführten Verhaltenstests (Garcia und Licking Test) deutlich verbesserte und die Tiere geringere neurologische Defizite aufwiesen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mikroplasmin das Infarktvolumen im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte. Das Ausmaß der Reduktion des Infarktvolumens war von der jeweiligen Mikroplasmindosis abhängig. Die stärkste Verringerung des Infarktvolumens konnte mit der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) erzielt werden. Es konnte ein dosisabhängiger Verlauf detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mikroplasmin die Degradation von Kollagen Typ IV, eine der Hauptkomponenten der Basallamina, dosisabhängig reduziert. Die besten Resultate konnten auch bezüglich dieses Parameters mit der höchsten Mikroplasminkonzentration (10mg) erzielt werden. Aufgrund der Erhaltung der zerebralen Mikrogefäße konnte festgestellt werden, dass Mikroplasmin nach zerebral fokaler Ischämie die Extravasation von Hämoglobin, also das Blutungsrisiko, vermindert. Auch hier konnte ein dosisabhängiger Verlauf detektiert werden, wobei mit der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) der geringste Austritt von Hämoglobin aus den Gefäßen in das Hirngewebe gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Mikroplasmin thrombolytische Aktivität besitzt und gleichzeitig neuroprotektiv wirkt. Mikroplasmin wirkt einerseits thrombolytisch, indem es thrombotisch verschlossene Gefäße wiedereröffnen kann. Gleichzeitig konnte im direkten Vergleich mit rt-PA gezeigt werden, dass Mikroplasmin den neurologischen Schaden minimiert¹⁰⁰. Unter der Gabe von Mikroplasmin zeigte sich ein deutlich kleineres Infarktvolumen. Da es nach einer Ischämie im Allgemeinen zu einer Minderperfusion und somit zur Zerstörung und zum Untergang von Hirngewebe kommt, ist davon auszugehen, dass ein kleineres Infarktvolumen mit einer geringeren Gewebeschädigung einher geht. Zusätzlich kann unter Mikroplasmingabe das neurologische Defizit reduziert und das neurologische

Outcome deutlich verbessert werden. Darüber hinaus gibt es bei der Behandlung mit Mikroplasmin im Gegensatz zur Therapie mit rt-PA keine sehr enge Limitierung eines Zeitfensters. Mikroplasmin wirkt aber nicht nur neuroprotektiv, sondern ist auch mikrovaskulär protektiv. So schützt Mikroplasmin vor der Degradation der mikrovaskulären Basallamina und sichert somit einen ausreichenden Blutfluss. Die gesicherte Mikrozirkulation minimiert wiederum den zellulären Gewebeschaden und schützt gleichzeitig vor schweren sekundären Folgen, v.a. in Form von Blutungskomplikationen und ödematösen Hirnschwellungen. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass Mikroplasmin zur experimentellen thrombolytischen Therapie geeignet ist, da es die Durchgängigkeit von thrombotisch verschlossenen Gefäßen effektiv wiederherstellt und somit die Blutzirkulation im Gehirn sichert. Gleichzeitig verbessert Mikroplasmin das neurologische Outcome, indem es sowohl neuroprotektiv, als auch mikrovaskulär protektiv wirkt: so konnten unter Mikroplasmingabe eine Verringerung der Infarktvolumina und der Degradation der mikrovaskuläre Basalmembran festgestellt werden.

Zu den möglichen Schädigungsmechanismen der mikrovaskulären Basallamina zählen die nicht-zellulären proteolytischen Systeme, wie das Matrixmetallo-Proteinase System und die endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikroplasmin den post-ischämischen Anstieg von MMP-2 und MMP-9 reduziert. Der Einfluss auf die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA war unterschiedlich. Während die u-PA Aktivität in den Basalganglien unter allen Mikroplasminkonzentrationen unbeeinflusst blieb, führte im Kortex das niedrig bis moderat dosierte Mikroplasmin zu einer Hochregulierung der u-PA Aktivität. Die hohe Mikroplasmindosis (10mg) hatte keinen Einfluss auf die u-PA Aktivität. Die t-PA Aktivität blieb von allen Mikroplasminkonzentrationen unbeeinflusst.

Die MMP Inhibitoren, die TIMPs, wirken protektiv auf die Basallamina. Die verschiedenen Mikroplasmindosen konnten die TIMPs nicht signifikant erhöhen. Auch das Verhältnis von Inhibitor/Protease konnte nur mit der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) in den Basalganglien zugunsten der Inhibitoren verschoben werden.

5.2. Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Verhaltenstests

Im klinischen Alltag stellen die Sicherung der Lebensqualität betroffener Schlaganfallpatienten durch die Reduktion des neurologischen Defizits und die Optimierung der gebotenen Ressourcen die Hauptziele der Schlaganfalltherapie dar (STAIR, 1999).

So zeigt sich das Vollbild eines Infarkts nach MCA-Okklusion im Mittel nach 24 Stunden. Es ist demnach erstaunlich, dass sich die neurologischen Defizite bereits am zweiten Tag nach dem ischämischen Ereignis verbessern (Takamatsu et al., 2002). Suzuki et al. (2004b) stellten eine signifikante Verbesserung des neurologischen Defizits nach Mikroplasmingabe im Rattenmodell nach thrombo-embolischer MCA-Okklusion fest. Dies wurde offensichtlich durch die Reduktion des Infarkt Volumens und die Verringerung der ödematösen Schwellung im Kortex erreicht. So konnte ein Mittelwert von sieben Punkten im Bederson Test erzielt werden. Dies bestätigt die Resultate von Lapchak et al. (2002a), die eine Verbesserung des Neuroscores nach Mikroplasmingabe im thrombo-embolischen Kaninchenmodell feststellten und somit ein besseres Outcome gegenüber t-PA aufzeigen konnten. Auch in dieser Arbeit, im Fadenmodell der transienten fokalen Ischämie, konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Mikroplasmin den Neuroscore erhöht und somit das neurologische Outcome verbessert. Es bleibt allerdings die Frage offen, wodurch letztlich die Verbesserung des Neuroscores erreicht wurde. So sollte diskutiert werden, ob dies durch die nachgewiesene Protektion des Hirngewebes durch Mikroplasmin (neuroprotektive Wirkung von Mikroplasmin) und/oder durch die rasche Rekanalisation (thrombolytische Wirkung des Mikroplasmins) und somit Limitierung der Infarktgröße nach Mikroplasmingabe ausreichend erklärt werden kann.

5.3. Der Einfluss von Mikroplasmin auf das Infarktvolumen

Die thrombolytische Therapie nach Ischämie ist vor allem von der frühzeitigen Intervention der verschlossenen Hirnarterie abhängig. Denn nach dem gängigen Konzept geht man von verschiedenen Zonen im durchblutungsgestörtem Versorgungsgebiet einer Hirnarterie aus. So bildet der sogenannte Core (Kern) das Zentrum, in dem bereits wenige Stunden nach Ischämie infarziertes Gewebe histologisch nachweisbar ist (Touho et al., 1996). Um das Kerngebiet herum befindet sich ein Randsaum, die sogenannte Penumbra. In diesem Gebiet ist die Auswirkung der Ischämie moderat, das heißt der Funktionsstoffwechsel ist eingeschränkt, bzw. erloschen, aber der Erhaltungsstoffwechsel und die Membranfunktionen sind noch intakt (Astrup et al., 1981). Dieses minderperfundierte, aber potentiell funktionsfähige Gebiet ist von der frühzeitigen Rekanalisation abhängig. Die Revitalisierung der Penumbra limitiert die Infarktgröße und verbessert die Überlebensrate (Nagai, et al. 2001). Die derzeit gängige Methode der Rekanalisation ist der Einsatz von Thrombolytika. So verglich Burggraf et al. (2009) die unterschiedlichen Wirkungsweisen der Thrombolytika Mikroplasmin, Alteplase und Tenecteplase (TNK) und stellten fest, dass eine Behandlung mit Mikroplasmin den stärksten protektiven

Effekt auf die Infarktgröße und das mikrovaskuläre System hat. Dies bestätigt die Ergebnisse von Suzuki et al. (2004), die eine Reduktion des Infarktvolumens nach Mikroplasmingabe in Ratten detektieren, dabei erfolgte die MCA-Okklusion durch einen photochemisch induzierten Thrombos. Diese Ergebnisse werden durch unsere Untersuchungen verifiziert, denn diese Arbeit zeigt, dass moderat bis hoch dosiertes Mikroplasmin nach zerebraler fokaler Ischämie die Infarktgröße in Ratten signifikant reduziert. Unsere Ergebnisse korrelieren auch mit ähnlichen Resultaten einer früheren Studie von Lapchak et al. (2002a). In dieser konnte im thrombo-embolischen Modell in Kaninchen nach Mikroplasmingabe, zwar keine Reduktion des Infarktvolumens, aber eine signifikante Reduktion der Hämorrhagien gezeigt werden. Die fehlende Reduktion des Infarktvolumens erklärten die Autoren mit einem Verweis auf andere Studien, in denen bereits mehrfach beschrieben wurde, dass Thrombolytika die Infarktanteile im thrombo-embolischen Modell nicht vermindern konnten, obwohl die Reperfusion nach dem Ereignis stets anstieg (Lapchak et al., 2001, 2002a, 2002b, 2002c).

5.4. Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Morphologie und Integrität der mikrovaskulären Basallamina

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass moderate bis hohe Mikroplasmindosen den Kollagen Typ IV Verlust aus der mikrovaskulären Basallamina und die nachfolgende Extravasation von Hämoglobin nach fokaler zerebraler Ischämie reduzieren. Dies bestätigt die Resultate von Burggraf et al. (2007), die feststellten, dass durch Mikroplasmin, im Vergleich sowohl zur Kontrollgruppe, als auch zu rt-PA behandelten Ratten, der Gehalt an Kollagen IV und die Gefäßzahl nur gering beeinflusst wird. Ferner minimiert Mikroplasmin das Risiko für Hämorrhagien im Vergleich zu rt-PA und TNK im Rattenmodell (Burggraf et al., 2009).

Die Integrität der zerebralen Mikrogefäße wird vor allem durch drei essentielle Mechanismen gewährleistet: (1) Die Blut-Hirn-Schranke, die aus den inter-endothelialen tight junctions der Endothelzellen aufgebaut ist, bildet die erste Permeabilitätsschranke und dient vor allem dem Stofftransport (del Zoppo et al., 2000). (2) Die Basalmembran dient als zweite strukturelle Barriere für die Extravasation von zellulären Blutbestandteilen, wenn die Blut-Hirn-Schranke zerstört worden ist. Sie ist in die extrazelluläre Matrix eingebettet und ist aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und anderen Proteoglykanen und Glykoproteinen aufgebaut. (3) Schließlich bilden perivaskuläre Astrozyten und Perizyten eine schützende Hülle um die zerebralen Mikrogefäße. Die Kommunikation der einzelnen Zellen wird durch sog. Integrine (Zellmatrix-Adhäsions-Moleküle) gewährleistet. Nach zerebraler Ischämie kommt es zur Zerstörung der Endothelzellbarriere und dem Verlust der Integrität der Basallamina

mit Extravasation von zellulären Blutbestandteilen in das Hirnparenchym (Hamann et al., 1995; 2002; Burggraf et al., 2009).

In vorausgegangenen experimentellen Studien konnte, nach MCA-Okklusion, ein Verlust an Laminin, Kollagen Typ IV und anderen essentiellen Bestandteilen der mikrovaskulären Basalmembran beobachtet werden (Hamann et al., 1995, 1996 und 2002). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verlust der Integrität der Basalmembran und dem Auftreten von hämorrhagischen Transformationen gezeigt werden (Hamann et al., 1996; Burggraf et al., 2008).

Es wurde bereits in früheren Studien der Einfluss von Mikroplasmin auf das Hirngewebe nach zerebraler Ischämie untersucht. So konnten Lapchak et al. bereits 2002 beschreiben, dass Mikroplasmin das neurologische Outcome im thrombo-embolischen Kaninchenmodell verbesserte und Mikroplasmin eine geringere Blutungstendenz als t-PA aufwies. Nagai et al. (2003) stellten fest, dass Mikroplasmin den Gewebeschaden im thrombo-embolischen Mausmodell reduzierte. Schließlich zeigten Suzuki et al. (2004b), dass Mikroplasmin den ischämischen Gewebeschaden nach thrombo-embolischer MCA-Okklusion in Ratten signifikant reduzierte und das neurologische Defizit verbesserte. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass moderat bis hoch dosiertes Mikroplasmin nach MCA-Okklusion in Ratten den Verlust von Kollagen Typ IV aus der Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße signifikant reduziert. Ferner konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hämoglobin Extravasation mit hohen Mikroplasmindosen reduziert werden kann. So dass von einer Verringerung der Zerstörung der Basalmembran und der Reduktion des Blutungsrisikos unter Gabe hoher Mikroplasmindosen ausgegangen werden kann.

5.5. Der Einfluss von Mikroplasmin auf die Matrixmetallo-Proteinase mit ihren Inhibitoren TIMP

Während zerebraler Ischämie kommt es zur Schädigung der Bluthirnschranke (Rosenberg et al., 1997 und 1999) und zum Verlust der Integrität der Basalmembran zerebraler Mikrogefäße und somit zur Ausbildung sekundärer Schäden wie Ödembildungen und petechialen Einblutungen (Hamann et al., 1996, 1999a und 2003). In vorangegangenen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Strategien zum Schutz der Mikrogefäße einen positiven Effekt haben. So konnten del Zoppo et al. (1991; 2003) feststellen, dass die Schädigung der Basalmembran nach zerebraler Ischämie durch die Aktivierung der Plasminogenaktivatoren u-PA und t-PA und/oder der Matrixmetallo-Proteinase und/oder der polymorphkernigen Leukozytengranula bedingt sein könnte.

Früheren Untersuchungen folgend, scheinen vor allem zwei MMP-Formen (MMP-2 und MMP-9) direkt in das Infarktgeschehen und in sekundäre Blutungskomplikationen

involviert zu sein (Sumii et al., 2002). Romanic et al. (1998) zeigten einen Anstieg von MMP-2 und MMP-9 in neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und Makrophagen nach permanenter MCA-Okklusion in Ratten. Pro-MMP-2 wird nach zerebraler Ischämie rasch vom Mikrogefäßsystem synthetisiert und sezerniert (Heo et al., 1999; Hosomi et al., 2001; Rosenberg et al., 1996). MMP-2 wird zum Teil konstitutiv exprimiert und ihre Aktivierung wird von membrangebundenen Metallo-Proteinasen (MT1-MMP) vermittelt. MMP-9 wird über unterschiedliche Wege aktiviert. Zum einen katalysiert Plasmin direkt die Umwandlung von pro-MMP-9 zu aktivem MMP-9. Zum anderen wird die Aktivierung von pro-MMP-9 zu MMP-9 durch das aktive MMP-3 katalysiert. In unterschiedlichen Studien konnte festgestellt werden, dass die Expression von MMP-9 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Hirnarealen anstieg. So konnte bereits eine Stunde nach Reperfusion eine erste erhöhte MMP-9 Aktivität im gesamten ischämischen Gehirnareal detektiert werden. Drei Stunden und 23 Stunden nach Reperfusion konnte ein noch stärkerer Anstieg von MMP-9 im Kortex beobachtet werden (Fujimura et al., 1999). Rosenberg et al. (1994; 1998; 2001) konnten MMP-9 bereits in der dritten Stunde nach zerebraler Ischämie nachweisen und konnten einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Aktivität von pro-MMP-9 und der Ödembildung nach MCA-Okklusion in Ratten beschreiben. Darüber hinaus ist bei Primaten eine Überexpression von pro-MMP-9 im ischämischen Areal mit hämorrhagischen Transformationen assoziiert (Heo et al., 1999). Burggraf et al. (2009) zeigten im Rattenmodell, dass Mikroplasmin, im Vergleich zur Kontrollgruppe, keinen Effekt auf die MMP-2 Aktivität, weder in der kontralateralen, noch in der ischämischen Hemisphäre, ausübte. Die MMP-9 Aktivität konnte auch bereits in klinischen Studien untersucht werden. So zeigten Castellanos und seine Kollegen (2003) an 250 Patienten auf, dass ein Zusammenhang zwischen einer hohen MMP-9 Konzentration und sekundären hämorrhagischen Blutungen besteht. Ferner zeigten Rosenberg et al. (1998), dass durch die Hemmung der Matrixmetallo-Proteinase das Infarktvolume verringert werden konnte.

In dieser Arbeit konnte durch eine dosisabhängige Mikroplasmingabe eine Verminderung der Schädigung der Basalmembran gezeigt werden (Schubert et al., 2007). Da es nach Gabe von rt-PA zu einer starken Aktivierung der MMPs kommt, sollte der Einfluss von Mikroplasmin auf das MMP-System untersucht werden. So konnte mit Hilfe von Zymographien festgestellt werden, dass es unter niedrig bis moderaten Mikroplasminkonzentrationen zu einem Anstieg der MMP-2 und MMP-9 Aktivität kam. Unter Gabe von hochdosiertem Mikroplasmin (10mg) konnte die MMP Aktivität signifikant reduziert werden. Gerade die Aktivitätssteigerung von MMP-9 wird mit der hämorrhagischen Transformation nach zerebraler Ischämie assoziiert

(Montaner et al., 2003). Die verminderte Aktivierung des MMP Systems durch Mikroplasmin könnte letztendlich zu der Reduktion des Schadens der Basalmembran beitragen.

Die Expression der endogenen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 wird durch fokale zerebrale Ischämie induziert. Das Überwiegen der Inhibitoren im Vergleich zu seinen Proteasen könnte ein physiologischer Mechanismus zur Minimierung der zerebralen Schädigung sein. Man vermutet, dass sich die Degradation der Basallamina verringert, wenn das Verhältnis von Inhibitor zu Protease zugunsten der Inhibitoren verschoben wird. Denn dadurch könnte der Abbau von Kollagen Typ IV, einer der Hauptbestandteil der Basallamina, durch die Proteasen gestoppt werden (Burggraf et al., 2009).

Burggraf et al. (2009) stellten fest, dass die endogenen Inhibitoren TIMP unter der Behandlung mit Tenecteplase (TNK) abfielen und das Verhältnis von Inhibitor zu Protease unter 1 sank. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Schädigungsparameter detektiert werden, so dass sich ein Zusammenhang zwischen dem niedrigen Inhibitoreniveau (bei gleichzeitig hohem Proteasenlevel) und dem Grad der Schädigung nach zerebraler Ischämie zeigte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass keine der verabreichten Mikroplasmindosen die endogenen Inhibitoren signifikant beeinflussen konnte. Dennoch konnte unter Mikroplasmingabe eine weitere Schädigung der Basalmembran verhindert werden, da eine weitestgehende Balance zwischen den MMPs und ihren endogenen Inhibitoren TIMP detektiert werden konnte. Es kam somit unter Mikroplasmingabe zu keinem weiteren Absinken der MMP Inhibitoren TIMP. Im Gegensatz dazu konnte unter der Therapie mit TNK im Rattenmodell ein deutliches Absinken der endogenen Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 aufgezeigt werden (Burggraf et al., 2009). Das Absinken der MMP Inhibitoren könnte ein weiterer Parameter sein, der zur Schädigung der Basalmembran beiträgt und könnte eine zusätzliche, mögliche Erklärung für die deutliche Degradation der Basalmembran unter TNK liefern (Burggraf et al., 2009).

5.6. Der Einfluss von Mikroplasmin auf das Plasminogen-Plasmin-System und die endogenen Plasminogenaktivatoren

Das Plasminogen-Plasmin-System hat Einfluss auf die Intaktheit der Blut-Hirn-Schranke. Durch die Aktivierung von Plasmin kommt es zu Änderungen der BL (Rudd et al., 1991; Rosenberg et al., 1994). Da Plasmin durch die endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA aktiviert wird und auch selbst durch positive Rückkoppelung v.a. die u-PA Aktivität erhöht, wurde der Einfluss der Plasminogenaktivatoren in dieser Arbeit untersucht. So konnte festgestellt werden, dass hochdosiertes Mikroplasmin (10mg) nach MCA-Okklusion die Aktivität des endogenen Plasminogenaktivators u-PA, vor allem im Kortex, reduzieren konnte.

Niedrig bis moderat dosiertes Mikroplasmin erhöhte dagegen die u-PA Aktivität. Die Aktivität von endogenem t-PA hingegen blieb von allen unterschiedlichen Mikroplasminkonzentrationen unbeeinflusst. Unsere Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, bei denen nach fokaler zerebraler Ischämie die t-PA Aktivität nicht verändert wurde (Hosomi et al., 2001; Burggraf et al., 2004). In anderen Arbeiten konnte eine Änderung der t-PA Aktivität festgestellt werden. So zeigten Wang et al. (1998), dass nach MCA-Okklusion Mäuse ohne t-PA einen geringeren neurologischen Schaden aufwiesen, als ihre Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse wurden von Nagai et al. (1999a) bestätigt. Nagai et al., stellten bei Inaktivierung des t-PA Gens an knock-out Mäusen ein kleineres Infarktvolume fest.

Rosenberg et al. beschrieben 1996 eine steigende u-PA und eine sinkende t-PA Aktivität nach MCA-Okklusion in Ratten. Diese unterschiedliche Aktivierung der endogenen Plasminogenaktivatoren könnte durch die frühe Stimulation von u-PA durch die Tumornekrosefaktoren α und β bedingt sein. Gleichzeitig könnten die Tumornekrosefaktoren zur Transformation vom Wachstumsfaktor β und Interleukin-1 β führen, welche die Endothelzellen, die t-PA synthetisieren und sezernieren, negativ beeinflussen (Docagne et al., 1999; Burggraf et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte eine selektive Reduktion der u-PA Aktivität durch 10mg Mikroplasmin im Kortex und den Basalganglien festgestellt werden. Niedrig bis moderat dosiertes Mikroplasmin führte im Kortex zu einer Steigerung der u-PA Aktivität. In unserer Arbeitsgruppe konnte in anderen Studien an Ratten festgestellt werden, dass nach rt-PA Gabe die u-PA Aktivität anstieg, wobei es durch höhere rt-PA Dosen zu einer weiteren, signifikanten Steigerung der u-PA Aktivität kam (Burggraf et al., 2003). Dabei zeigte sich der u-PA Anstieg v.a. in den Basalganglien und weniger im Kortex. Burggraf et al. (2003) erklärten den vornehmlichen u-PA Anstieg in den Basalganglien damit, dass die signifikante Degradation von Kollagen Typ IV, eine der Hauptkomponente der Basallamina, v.a. im Zentrum der Ischämie, also in den Basalganglien stattfindet. Die Reduktion, bzw. fehlende Hochregulierung von u-PA nach fokaler zerebraler Ischämie nach Gabe von hochdosiertem Mikroplasmin (10mg) könnte ein weiterer Weg sein, der zur mikrovaskulären Protektion beiträgt.

5.7. Die methodischen und konzeptionellen Limitationen der Arbeit

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse müssen einige Punkte beachtet werden. Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen wurde zunächst nur die 10mg Mikroplasmingruppe designt. Nach erfolgversprechenden Ergebnissen wurden weitere Mikroplasmingruppen kreiert um den dosisabhängigen Verlauf von Mikroplasmin beurteilen zu können. Dadurch und durch das Versterben von sechs Tieren kam es

letztlich zu unterschiedliche großen Tiergruppen (10mg Mikroplasmin, n=15; 5mg Mikroplasmin, n=13; Kontrollgruppe, n=8; 2,5mg Mikroplasmin n=7; 0,5mg und 1mg Mikroplasmin, n=6), die miteinander verglichen wurden. Durch die Berechnung der Mittelwerte und einem Minimum von sechs Tieren pro Gruppe sollte dieser Parameter als vernachlässigbar betrachtet werden.

Desweiteren sollte die mögliche unterschiedliche Dosierung bei Ratten und Menschen bedacht werden. So wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Mikroplasmindosen (0,5mg, 1mg, 2,5mg, 5mg und 10mg) verwendet, wobei die besten Ergebnisse mit der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) erzielt werden konnten. Die zunächst eingesetzte Dosis von 10mg wurde analog zu der, in früheren experimentellen Untersuchungen verwendeten, Dosierung von 10mg (bzw. 9mg) rt-PA gewählt. Eine Dosierung von 10mg (bzw. 9mg) rt-PA in Ratten entspricht der Evidenz basierten Dosierung von 1mg/kg KG beim Menschen. Die in aktuellen, klinischen Studien verwendeten Mikroplasmindosen zur Therapie eines akuten ischämischen Schlaganfalls wurden aber mit 2, 3 und 4 mg/kg Mikroplasmin durchgeführt (siehe Abschnitt 5.9). Demnach wurden in den aktuellen klinischen Studien deutlich höhere Dosen verwendet. Sollten die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen auf den klinischen Alltag übertragen werden können, könnten weitere klinische Studien mit niedriger dosiertem Mikroplasmin (1mg) geplant werden.

5.8. Der Vergleich von Fadenmodell und thrombo-embolischem Modell

Generell ist es bei der Auswahl des experimentellen Modells wichtig folgende Punkte zu beachten (Hartmann et al., 2001): (1) die Reproduzierbarkeit des ischämischen Schadens und seiner Ausdehnung, (2) die Relevanz in Bezug auf das klinischen Krankheitsbildes, (3) die technische Einfachheit der operativen Maßnahmen, die für das Modell benötigt werden und (4) die Übertragbarkeit des experimentellen Modells auf die klinische Situation.

In dieser Arbeit wurde das Fadenmodell der MCA-Okklusion („middle cerebral artery occlusion“) verwendet. Das Modell der intraluminalen fokalen zerebralen Ischämie mit anschließender Reperfusion wurde erstmals 1985 von Koizumi entwickelt und 1989 von Longa et al. modifiziert. (1) Das Fadenmodell weist eine große Reproduzierbarkeit im Gegensatz zu der weit verbreiteten Alternative, dem thrombo-embolische Modell der MCA-Okklusion, auf. Mit dem Fadenmodell können reproduzierbare große Infarkt volumina durch das Miterfassen der striatalen Äste der A. cerebri media, hervorrufen werden (Peters, et al.⁹⁸). Darüber hinaus kann mit dem Fadenmodell die Reperfusion gezielt gesichert werden. (2) Schlaganfallerkrankungen sind die dritthäufigste Todesursache und die Aufklärung der molekularen Mechanismen für

neue Therapieansätze ist somit unabdingbar. (3) Die operativen Maßnahmen des Fadenmodells können erlernt werden und der Erfolg kann über verschiedene Parameter (z.B. durch Verwendung der Laser-Doppler-Blutflussmethode und eines „fernsteuerbaren“ Führungsdrahts) überprüft werden. Darüber hinaus kann die Schädeldecke durch die minimal-invasiven Operationseingriffe im Gegensatz zur offenen Kraniotomie verschlossen bleiben. Dadurch werden beispielsweise die BHS und der intrakranielle Druck nicht beeinflusst. (4) Das Fadenmodell zeigt den direkten Einfluss des Thrombolytikums auf die Gefäße auf, so dass, im Gegensatz zum thrombo-embolischen Modell, keine Wechselwirkungen mit Thromben berücksichtigt werden müssen. Dagegen kann mit dem thrombo-embolische Modell die klinische Situation besser wiedergespiegelt werden (Zhang et al., 1997; Vosko et al., 2003). Mögliche Fehlerquellen des Fadenmodells bestehen in der Induktion von Blutungen durch Verletzung der Gefäßwand und in der Thrombosierung des verschlossenen Gefäßabschnittes. Um mögliche Blutungen ausschließen zu können, wurden die Gehirne nach der Entnahme genau inspiziert.

5.9. Die Schlussfolgerungen und weitere Ausblicke

Ziel dieser Arbeit war es, das alternative Thrombolytikum Mikroplasmin näher zu untersuchen, um das Risiko-Nutzen-Verhältnis einer Thrombolyse mit Mikroplasmin beurteilen zu können. Eine Verbesserung der mikrovaskulären Integrität mit nachfolgender Reduktion der Blutungsrate ist grundsätzlich über verschiedene Wege möglich (Hamann et al., 1999a, 1999b): (1) durch eine Vergrößerung des individuellen Zeitfensters zur Behandlung des Patienten, (2) durch pharmakologische Interventionen, die während der Thrombolyse die Basalmembran schützen und (3) der immunohisto- und biochemische Nachweis der Basalmembranschädigung, um gezielt in diesen Mechanismus eingreifen zu können und um Interventionen ausschließen zu können.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, dass Mikroplasmin die negativen Auswirkungen eines Thrombolytikums in Bezug auf Infarktgröße, Verlust der Integrität der Basallamina und das neurologischen Outcome nach zerebraler Ischämie deutlich verringern kann. Hierbei konnte ein dosisabhängiger Verlauf detektiert werden. Insbesondere die höchste Mikroplasmindosis (10mg) zeigte positive Ergebnisse. So konnten neben einem protektiven Effekt auf die mikrovaskuläre Basalmembran, auch eine Reduktion der Hämoglobin Extravasation und die Verringerung der Aktivierung des Matrixmetallo-Proteinase Systems und der Plasminogenaktivatoren aufgezeigt werden. Dagegen hatte Mikroplasmin auf die endogenen MMP Inhibitoren TIMP keinen Einfluss.

Die Mikroplasmingabe könnte somit eine Alternative zur gängigen intravenösen Lysetherapie mit rt-PA darstellen. Da Mikroplasmin neuroprotektiv ist, kommt es nach einer Mikroplasmingabe zur Reduktion des neurologischen Defizits und Outcomes, bei gleichzeitiger Senkung des Risiko und des Schweregrads für Hämorrhagien und hämorrhagische Transformationen nach zerebraler Ischämie. Demnach konnten in dieser Arbeit alle anfangs gestellten Fragen beantwortet werden.

Das Risiko-Nutzen-Verhältnis für Mikroplasmin hat sich somit in dieser Arbeit als sehr positiv erwiesen. Da Mikroplasmin eine attraktive Alternative zur gängigen intravenösen rt-PA Thrombolyse darstellt, ist es nun, nach der experimentellen Evaluierung, wichtig die Ergebnisse der bereits laufenden klinischen Studien zu erfassen und auszuwerten. So klingen die ersten Ergebnisse der bereits laufenden klinischen Studien (MITI-IV, Intravenous Administration of Microplasmin for Treatment of Acute Ischemic Stroke) sehr vielversprechend: In Phase I der klinischen Studie wurde Mikroplasmin intravenös (MITI-IV = Microplasmin in Treatment of Ischemic stroke, intravenous) bis zu einer Dosis von 4 mg/kg KG gut toleriert (Pakola et al., 2006). Die Ergebnisse der Phase II präsentierte Dr. Vincent Thijs im September 2008 auf dem „6th World Stroke Congress“ in Wien. Bei der klinischen Studie wurden 40 Patienten innerhalb von 4-12 Stunden nach Beginn eines akuten ischämischen Schlaganfalls mit Mikroplasmin (2, 3 und 4 mg/kg KG) behandelt. Das klinische Outcome wurde nach sieben und nach 30 Tagen bestimmt. Die Studie zeigte, dass Mikroplasmin gut vertragen wurde und es konnten keine Anzeichen für ein erhöhtes Blutungsrisiko (auch im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe) gefunden werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei 25% der Patienten, die Mikroplasmin erhalten hatten es innerhalb von acht Stunden zur Reperfusion kam. Bei den Placebo-behandelten Patienten waren es nur 10%. Außerdem konnte bei den Mikroplasmin-behandelten Patienten eine signifikante Reduktion des Schadens an der Blut-Hirn-Schranke (durch Messung der MMPs), im Vergleich zu den Placebo-behandelten Patienten festgestellt werden⁹⁹.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es Mikroplasmin als alternatives Thrombolytikum in Bezug auf sein Risiko/Nutzen Profil zu untersuchen. Die intravenöse Gabe von rt-PA ist die derzeit einzige zugelassene und evidenzbasierte Lysetherapie zur akuten ischämischen Schlaganfallbehandlung. Aufgrund des bekannten hohen Nebenwirkungsrisikos (v.a. in Form von schweren Blutungskomplikationen) und des kleinen therapeutischen Zeitfensters von nur drei Stunden sollten dringend weiter lytische Agentien gefunden werden. Diese sollten mit weniger Nebenwirkungen einhergehen, um letztlich das Outcome und die Lebensqualität jedes einzelnen Schlaganfallpatienten sichern zu können.

Unter Verwendung des Fadenmodells konnte experimentell an Ratten durch MCA-Okklusion eine fokale, zerebrale Ischämie induziert werden. Nach immunohisto- und biochemischer Aufarbeitung der Rattengehirne konnte der Effekt von Mikroplasmin auf die zerebralen Mikrogefäße, die Basalmembran, das Infarktvolumen, das MMP-System (MMP-2 und MMP-9; TIMP-1 und TIMP-2) und die endogenen Plasminogenaktivatoren (t-PA und u-PA) untersucht werden.

Es zeigte sich, dass v.a. die hohe Mikroplasminkonzentration (10mg) neuroprotektiv wirkt und somit zu einer Verbesserung des neurologischen Outcomes und zur Reduktion des Infarktvolumens führt. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Mikroplasmin (10mg) auch mikrovaskulär protektiv ist und somit die mikrovaskuläre Basalmembran vor ihrem Abbau und sekundären Blutungen schützt. So konnte eine Reduktion der Hämoglobin Extravasation festgestellt werden. Mitverantwortlich für die mikrovaskuläre Schädigung der Basallamina sind das Matrixmetallo-Proteinase System und die endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA. In dieser Arbeit konnte eine Verringerung der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 festgestellt werden. Die t-PA Aktivität blieb unbeeinflusst, während u-PA nur unter Behandlung von 10mg Mikroplasmin nicht hochreguliert wurde. Da Plasmin durch positive Rückkoppelung die u-PA Aktivität steigert, könnte dies eine mögliche Erklärung darstellen.

Es kann demnach von einem protektiven Einfluss von Mikroplasmin auf das Gefäßsystem und das neurologische Outcome ausgegangen werden. Die endogenen MMP Inhibitoren TIMP hemmen die MMPs, indem sie mit ihnen einen Komplex bilden und somit den Abbau der Basallamina durch die MMPs verhindern. In dieser Arbeit hatte keine der verschiedenen Mikroplasmindosen Einfluss auf die endogenen Inhibitoren TIMP. Insgesamt konnte in unseren experimentellen Untersuchungen mit Mikroplasmin ein dosisabhängiger Verlauf detektiert werden. Die besten Resultate konnten stets mit der höchsten Mikroplasmindosis (10mg) erzielt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass Mikroplasmin ein potentiell geeignetes und alternatives Thrombolytikum zur gängigen intravenösen rt-PA Therapie darstellt. So konnte gezeigt werden, dass Mikroplasmin ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweist, gerade in Bezug auf die schweren hämorrhagischen Transformationen.

Die ersten Ergebnisse der bereits laufenden klinischen Studien (MITI-IV, Intravenous Administration of Microplasmin for Treatment of Acute Ischemic Stroke) klingen sehr vielversprechend. So präsentierte Dr. Vincent Thijs im September 2008 auf dem „6th World Stroke Congress“ in Wien bereits die klinischen Ergebnisse der Phase II. Es konnte an 40 Patienten festgestellt werden, dass die mit Mikroplasmin-behandelten (2, 3 und 4 mg/kg KG) Patienten keine Anzeichen für ein erhöhtes Blutungsrisiko aufwiesen, außerdem konnte eine signifikante Reduktion des Schadens auf die Blut-Hirn-Schranke, im Vergleich zu den mit Placebo-behandelten Patienten, festgestellt werden⁹⁹.

Daher sollten in absehbarer Zukunft die bereits laufenden klinischen Studien fortgeführt und vollständig erfasst werden, um die klinische Situation des Schlaganfallpatienten optimieren zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abrahamson DR** (1986)
Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol.* 1986 Aug;149(4):257-78.
2. **Abumiya T**, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999)
Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Sep;19(9):1038-50.
3. **Ahn MY**, Zhang ZG, Tsang W, Chopp M (1999)
Endogenous plasminogen activator expression after embolic focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 1999 Aug 7;837(1-2):169-76.
4. **Astrup J**, Siesjö BK, Symon L (1981)
Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981 Nov-Dec;12(6):723-5.
5. **Burggraf D**, Martens HK, Jäger G, Hamann GF (2003)
Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb Haemost.* 2003 Jun;89(6):1072-80.
6. **Burggraf D**, Martens HK, Wunderlich N, Jäger G, Hamann GF (2004)
Rt-PA causes a significant increase in endogenous u-PA during experimental focal cerebral ischemia. *Eur J Neurosci.* 2004 Dec;20(11):2903-8.
7. **Burggraf D**, Trinkl A, Burk J, Martens HK, Dichgans M, Hamann GF (2008)
Vascular integrin immunoreactivity is selectively lost on capillaries during rat focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 2008 Jan 16;1189:189-97. *Epub 2007 Nov 7.*
8. **Burggraf D**, Vosko M, Trinkl A, Schubert M, Stassen J-M, Dichgans M, Hamann GF (2009)
Differential actions of thrombolytic agents on the microvascular damage following experimental focal cerebral ischemia: a comparison of alteplase, tenecteplase and microplasmin. *eingereicht*

9. **Castellanos M**, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A (2003)
Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003 Jan;34(1):40-6
10. **Chen F**, Suzuki Y, Nagai N, Sun X, Wang H, Yu J, Marchal G, Ni Y (2007)
Microplasmin and tissue plasminogen activator: comparison of therapeutic effects in rat stroke model at multiparametric MR imaging. *Radiology*. 2007 Aug;244(2):429-38. Epub 2007 Jun 20.
11. **Clark WM**, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S (1999)
Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA*. 1999 Dec 1;282(21):2019-26.
12. **Collen D** (1980)
On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost*. 1980 Jun 18;43(2):77-89.
13. **Cockett MI**, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJP (1998)
Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem Soc Symp*. 1998;63:295-313
14. **Deetjen P**, Speckmann EJ, Hescheler J (1992) Physiologie. 1. Auflage, Urban&Schwarzenberg, München, 1992
15. **del Zoppo GJ**, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991)
Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991 Oct;22(10):1276-83.
16. **del Zoppo GJ**, Hallenbeck JM (2000)
Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res*. 2000 May 1;98(3):73-81.

17. **del Zoppo GJ**, Mabuchi T (2003)
Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Aug;23(8):879-94.
18. **Dietrich WD** (1998)
Neurobiology of stroke. *Int Rev Neurobiol.* 1998;42:55-101.
19. **Dirnagl U**, Iadecola C, Moskowitz MA (1999)
Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999 Sep;22(9):391-7.
20. **Docagne F**, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (1999)
Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J.* 1999 Aug;13(11):1315-24.
21. **Estrada C**, Bready JV, Berliner JA, Pardridge WM, Cancilla PA. (1990)
Astrocyte growth stimulation by a soluble factor produced by cerebral endothelial cells in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1990 Nov;49(6):539-49.
22. **European Cooperative Acute Stroke Study** (1995)
Hacke W, Kaste M, Fieschi C et al.
Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274; 1017.25
23. **Fujimura M**, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH (1999)
Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999 Sep 18;842(1):92-100.
24. **Garcia JH**, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995)
Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 1995 Apr;26(4):627-34; discussion 635.
25. **Gasche Y**, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001)
Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Dec;21(12):1393-400.

26. **Grau AJ**, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC (2001)
Risk factors, Outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*. 2001 Nov;32(11):2559-66.
27. **Grobholz K**, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M, Hamann FG (2005)
Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia. *Neurol Res*. 2005 Mar;27(2):212-7.
28. **Gulyaeva N**, Thompson C, Shinohara N, Lazareva N, Onufriev M, Stepanichev M, Moiseeva Y, Fliss H, Hakim AM (2003)
Tongue protrusion: a simple test for neurological recovery in rats following focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods*. 2003 May 30;125(1-2):183-93.
29. **Hamann GF**, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. (1995)
Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2120-6.
30. **Hamann GF**, Okada Y, del Zoppo GJ (1996)
Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Nov;16(6):1373-8.
31. **Hamann GF**, del Zoppo GJ, von Kummer R (1999a)
Hemorrhagic transformation of cerebral infarction--possible mechanisms. *Thromb Haemost*. 1999 Sep;82 Suppl 1:92-4.
32. **Hamann GF**, del Zoppo GJ, von Kummer R (1999b)
[Mechanisms for the development of intracranial hemorrhage. Possible implications for thrombolysis in cerebral infarct]. *Nervenarzt*. 1999 Dec;70(12):1116-20.
33. **Hamann GF**, Liebetrau M, Martens H, Burggraf D, Kloss CU, Bültemeier G, Wunderlich N, Jäger G, Pfefferkorn T (2002)
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.
34. **Hamann GF** (2003)
Unriddling the role of matrix metalloproteinases in human cerebral stroke. *Stroke*. 2003 Jan;34(1):40-6.

35. **Hartmann A**, Heiss WD (2001)
Der Schlaganfall. Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie acuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. *Steinkopff, Darmstadt 2001*
36. **Heo JH**, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999)
Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jun;19(6):624-33.
37. **Hosomi N**, Lucero J, Heo JH, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (2001)
Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2001 Jun;32(6):1341-8.
38. **Hurwitz AA**, Berman JW, Rashbaum WK, Lyman WD (1993)
Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res.* 1993 Oct 22;625(2):238-43.
39. **Kloss CU**, Thomassen N, Fesl G, Martens KH, Yousri TA, Hamann GF (2003)
Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res.* 2002 Oct;24(7):713-8.
40. **Koizumi J**, Nakazawa T, Yoshida Y (1985)
Reperusable brain infarction model in rat (abstract). *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japan, April 18-19, 1985, p 159.*
41. **Krause D**, Kunz J, Dermietzel R (1993)
Cerebral pericytes--a solid line of defense in controlling blood-brain barrier peptide metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 1993;331:149-52.
42. **Lapchak PA**, Chapman DF, Zivin JA (2000)
Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 2000 Dec;31(12):3034-40.
43. **Lapchak PA**, Chapman DF, Zivin JA (2001)
Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitron (PBN) and 2,2,6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2001 Jan;32(1):147-53.

44. **Lapchak PA**, Araujo DM, Pakola S, Song D, Wei J, Zivin JA (2002a)
Microplasmin: a novel thrombolytic that improves behavioral Outcome after embolic strokes in rabbits. *Stroke*. 2002 Sep;33(9):2279-84.
45. **Lapchak PA**, Araujo DM, Song D, Wei J, Purdy R, Zivin JA (2002b)
Effects of the spin trap agent disodium- [tert-butylimino)methyl]benzene-1,3-disulfonate N-oxide (generic NXY-059) on intracerebral hemorrhage in a rabbit Large clot embolic stroke model: combination studies with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2002 Jun;33(6):1665-70.
46. **Lapchak PA**, Araujo DM, Song D, Zivin JA (2002c)
The nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa platelet receptor antagonist SM-20302 reduces tissue plasminogen activator-induced intracerebral hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2002 Jan;33(1):147-52.
47. **Longa EZ**, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989)
Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84-91.
48. **Marder VJ**, Landskroner K, Novokhatny V, Zimmerman TP, Kong M, Kanouse JJ, Jesmok G (2001)
Plasmin induces local thrombolysis without causing hemorrhage: a comparison with tissue plasminogen activator in the rabbit. *Thromb Haemost*. 2001 Sep;86(3):739-45.
49. **Marder VJ**, Stewart D (2002)
Towards safer thrombolytic therapy. *Semin Hematol*. 2002 Jul;39(3):206-16.
50. **Mazziere R**, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P (1997)
Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J*. 1997 May 1;16(9):2319-32.
51. **Minakawa T**, Bready J, Berliner J, Fisher M, Cancilla PA (1991)
In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. *Lab Invest*. 1991 Jul;65(1):32-40.

52. **Molina CA**, Saver JL (2005)
Extending reperfusion therapy for acute ischemic stroke: emerging pharmacological, mechanical, and imaging strategies. *Stroke*. 2005 Oct;36(10):2311-20. Epub 2005 Sep 22.
53. **Monea S**, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P (2002)
Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2002 Aug;192(2):160-70.
54. **Montaner J**, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J (2003)
Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003 Feb 4;107(4):598-603.
55. **Nagase H** (1997)
Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.
56. **Nagai N**, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D (1999a)
Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2440-4.
57. **Nagai N**, Vanlinthout I, Collen D (1999b)
Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation*. 1999 Dec 21-28;100(25):2541-6.
58. **Nagai N**, De Mol M, Van Hoef B, Verstreken M, Collen D (2001)
Depletion of circulating alpha(2)-antiplasmin by intravenous plasmin or immunoneutralization reduces focal cerebral ischemic injury in the absence of arterial recanalization. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3086-92.
59. **Nagai N**, Demarsin E, Van Hoef B, Wouters S, Cingolani D, Laroche Y, Collen D (2003)
Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties. *J Thromb Haemost*. 2003 Feb;1(2):307-13.

60. **National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Study Group** (1995)
Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N engl J Med* 333: 1581-1587.
61. **Pakola S**, Collen D (2006)
Microplasmin: a novel, direct-acting thrombolytic for treatment of acute vascular occlusions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis, Volume 4, Supplement 1, October 2006*, pp. 53-53(1)
62. **Parry MA**, Zhang XC, Bode I (2000)
Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem Sci.* 2000 Feb;25(2):53-9.
63. **Pessin MS** (1991)
Hemorrhagic transformation in the natural history of acute embolic stroke. (In) *Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke* (Hacke W, del Zoppo GJ, Hirschberg M, eds) *Heidelberg, Springer-Verlag* (pp) 67–74
64. **Pfefferkorn T**, Staufer B, Liebetrau M, Bültemeier G, Vosko MR, Zimmermann C, Hamann GF (2000)
Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Feb;20(2):337-42.
65. **Pulsinelli W** (1992)
Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet.* 1992 Feb 29;339(8792):533-6.
66. **Rijken DC** (1995)
Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol.* 1995 Jun;8(2):291-312.
67. **Risau W**, Esser S, Engelhardt B (1998)
Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol Biol (Paris).* 1998 Mar;46(3):171-5.
68. **Romanic AM**, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998)
Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke.* 1998 May;29(5):1020-30.

69. **Rosenberg GA**, Dencoff JE, McGuire PG, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1994)
Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain. *Lab Invest.* 1994 Sep;71(3):417-22.
70. **Rosenberg GA**, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996)
Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 May;16(3):360-6.
71. **Rosenberg GA**, Navratil M (1997)
Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology.* 1997 Apr;48(4):921-6.
72. **Rosenberg GA**, Estrada EY, Dencoff JE (1998)
Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 1998 Oct;29(10):2189-95.
73. **Rosenberg GA** (1999)
Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis.* 1999 Nov-Dec;42(3):209-16.
74. **Rosenberg GA**, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A (2001)
Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res.* 2001 Mar 2;893(1-2):104-12.
75. **Rudd MA**, Johnstone MT, Rabbani LE, George D, Ware JA, Loscalzo J (1991)
Thrombolytic therapy causes an increase in vascular permeability that is reversed by 1-deamino-8-D-vasopressin. *Circulation.* 1991 Dec;84(6):2568-73.
76. **Sato H**, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994)
A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 1994 Jul 7;370(6484):61-5.
77. **Schreiber SS**, Tan Z, Sun N, Wang L, Zlokovic BV (1998)
Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery.* 1998 Oct;43(4):909-13.

78. **Schubert M**, Burggraf D, Vosko M, Dichgans M, Hamann GF (2007)
„Dose-dependent Microplasmin reduces microvascular basal lamina damage and blood brain disruption in experimental focal cerebral ischemia“. *Posterpräsentation, The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain '07) and the 8th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (BrainPET'07), Osaka, Japan*
79. **Shi GY**, Wu HL (1988)
Isolation and characterization of microplasminogen. A low molecular weight form of plasminogen. *J Biol Chem.* 1988 Nov 15;263(32):17071-5.
80. **Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR)** (1999)
Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke.* 1999 Dec;30(12):2752-8.
81. **Sumii T**, Lo EH (2002)
Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 2002 Mar;33(3):831-6.
82. **Suzuki Y**, Nagai N, Collen D (2004a)
Comparative effects of microplasmin and tissue-type plasminogen activator (tPA) on cerebral hemorrhage in a middle cerebral artery occlusion model in mice. *J Thromb Haemost.* 2004 Sep;2(9):1617-21.
83. **Suzuki Y**, Chen F, Ni Y, Marchal G, Collen D, Nagai N (2004b)
Microplasmin reduces ischemic brain damage and improves neurological function in a rat stroke model monitored with MRI. *Stroke.* 2004 Oct;35(10):2402-6. Epub 2004 Aug 19.
84. **Takamatsu H**, Tatsumi M, Nitta S, Ichise R, Muramatsu K, Iida M, Nishimura S, Umemura K (2002)
Time courses of progress to the chronic stage of middle cerebral artery occlusion models in rats. *Exp Brain Res.* 2002 Sep;146(1):95-102. Epub 2002 Jun 13.
85. **Touho H**, Karasawa J (1996)
Evaluation of time-dependent thresholds of cerebral blood flow and transit time during the acute stage of cerebral embolism: a retrospective study. *Surg Neurol.* 1996 Aug;46(2):135-45; discussion 145-6.

86. **Touzani O**, Young AR, Derlon JM, Beaudouin V, Marchal G, Rioux P, Mézence F, Baron JC, MacKenzie ET (1995)
Sequential studies of severely hypometabolic tissue volumes after permanent middle cerebral artery occlusion. A positron emission tomographic investigation in anesthetized baboons. *Stroke*. 1995 Nov;26(11):2112-9.
87. **Vempati P**, Karagiannis ED, Popel AS (2007)
A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J Biol Chem*. 2007 Dec 28;282(52):37585-96. Epub 2007 Sep 11.
88. **Vosko MR**, Busch E, Burggraf D, Bültemeier G, Hamann GF (2003)
Microvascular basal lamina damage in thromboembolic stroke in a rat model. *Neurosci Lett*. 2003 Dec 26;353(3):217-20.
89. **Wang YF**, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998)
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.
90. **Wolf PA** (1993)
Lewis A. Conner Lecture. Contributions of epidemiology to the prevention of stroke. *Circulation*. 1993;88:2471-2478
91. **Wu HL**, Shi GY, Bender ML (1987a)
Preparation and purification of microplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(23):8292-5.
92. **Wu HL**, Shi GY, Wohl RC, Bender ML (1987b)
Structure and formation of microplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):8793-5.
93. **Yamaguchi T**, Mori E, Minematsu K, Nakagawara J, Hashi K, Saito I, Shinohara Y; Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT) Group (2006)
Alteplase at 0.6 mg/kg for acute ischemic stroke within 3 hours of onset: Japan Alteplase Clinical Trial (J-ACT). *Stroke*. 2006 Jul;37(7):1810-5. Epub 2006 Jun 8.
94. **Yurchenco PD**, Schittny JC (1990)
Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990 Apr 1;4(6):1577-90.

95. **Yu AE**, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG (1997)
Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* 1997 Sep;11(3):229-44.
96. **Zhang Z**, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M (1997)
A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Feb;17(2):123-35.

Internetseiten:

97. <http://www.kerckhoffklinik.de/files2/images/anaesthesie/Gehirnkapillare%20%5BQuerschnitt%5D.jpg>
98. <http://www.charite.de/ch/neuro/forschung/teams/experimentell/fadenratte.html>
99. <http://www.bio-medicine.org/medicine-technology-1/ThromboGenics-Announces-Promising-Results-of-MITI-IV-Phase-II-Trial-in-the-Treatment-of-Acute-Stroke-with-Microplasmin-3169-1/>
100. <http://www.bioportfolio.com/LeadDiscovery/thr006.htm>

veröffentlichte Abschnitte dieser Arbeit:

1. **Vosko MR**, Schubert M, Trinkl A, Stassen JM, Dichgans M, Hamann GF (2005)
„Microplasmin reduces microvascular damage and blood brain barrier disruption following experimental stroke“. 78. Kongress der deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie, Wiesbaden
2. **Schubert M**, Burggraf D, Vosko M, Dichgans M, Hamann GF (2007)
„Dose-dependent Microplasmin reduces microvascular basal lamina damage and blood brain disruption in experimental focal cerebral ischemia“. The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain '07) and the 8th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (BrainPET'07), Osaka, Japan

8. Anhang

8.1. Die Masterprotokolle

8.1.1. Das Nissl Färbeprotokoll

Behälter	Inhalt	Zeit
1. Küvette	Nissl	3 min
2. Küvette	Natrium-Acetat-H ₂ O	3 min
3. Küvette	Aqua dest.	3 min
4. Küvette	70% Ethanol	3 min
5. Küvette	Aqua dest.	3 min

Herstellung von Nissl

980 ml Aqua dest.

9,6 ml 100%ige Essigsäure

5,44 g Natrium-Acetat

5 g Kresylviolett

Herstellung von Natrium-Acetat- H₂O

980 ml Aqua dest.

9,6 ml 100%ige Essigsäure

5,44 g Natrium-Acetat

8.1.2. Das Kollagen Peroxidase Protokoll

Material/Anwendung	Konzentration	Zeit
Fixierung der Schnitte	1:1 Aceton:Chloroform	5 min
Lufttrocknen		10 min
Spülen in PBS		3 x 5 min
Inkubation in Blotto		20 min
Ränder trocken wischen		
Inkubation mit Primär-Antikörper	1:800 in reagent dilution	2h bei 37°C und über Nacht bei 4°C
Spülen in PBS		3 x 10 min
Ränder trocken wischen		
Inkubation mit Sekundär-Antikörper	1:200 in PBS: 5µl AK, 15µl Horse serum, 1µl Tween 20 (10%ig) in 1ml PBS	30 min bei 37°C
Spülen in PBS		3 x 10 min
Inkubation mit Wasserstoffperoxid	100µl H ₂ O ₂ (30%ig) in 100ml PBS	20 min bei RT
Spülen in Leitungswasser		3 min
Spülen in PBS		3 x 5 min
Ränder trocken wischen		
Inkubation mit ABC-Komplex	20µl A und 20µl B in 1µl Tween 20 (10%ig) 1ml PBS	30 min bei 37°C
Spülen in PBS		3 x 5 min
Spülen in Aqua dest.		kurz eintauchen
Zusatz des Chromogens (AEC)	5ml Aqua dest., 2 Tropfen Buffer, 3 Tropfen AEC und 2 Tropfen H ₂ O ₂	max. 10 min bei 37°C im Dunkeln
Spülen in Leitungswasser		3 min

Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper:	Goat Anti-Type IV Collagen-UNLB, Southern Biotechnology associates, Inc., Birmingham, AL, USA
Sekundär-Antikörper:	biotinylated anti-goat IgG (H+L), Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010

Rezepte für Stock solutions

Tris saline stock	6,06g Tris-HCl (0,05 M) 8,77 g NaCl (0,9%) in 1.000 ml Aqua dest.
PBS	1,48 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,43 g Kaliumdihydrogenphosphat 7,20 g NaCl in 1.000 ml Aqua dest.
Blotto	100 ml Tris saline stock 5 g Nonfat dry milk 1 ml Horse serum 0,02 g Natriumazid
Reagent dilution	50 ml Tris saline stock 20 mg BSA 25 mg Thimerosal

8.1.3. Die Übersicht über die biochemischen Protokolle

Art	Anzahl OT à 2 Schnitte	Gel	Homogen. Puffer	Auftragen	Blockierung	1. AK	2. AK
Kollagen WB	3	7.5% SDS (0,75mm)	2% SDS 15µl	7µl Probe 4µl AP	1,5% Milchpulver 3% BSA	Anti Coll IV 1:400	Anti Goat IgG 1:1.000
Hämoglobin WB	4	7.5% SDS (0,5mm)	2% SDS 20µl	10µl Probe, 5µl AP	1,5% Milchpulver 3% BSA	1:2000 Anti Hämoglobin	1:1.000 Anti Rabbit
MMP Zymographie	4	Gel und Gelatine	15µl MMP-Homogen. Puffer (+PMSF)	9µl Probe, 3µl AP	Nach Elpho 1h mit Renaturierungspuffer bei RT, Inkubation über Nacht bei 37°C mit Inkubationspuffer (beide 1:10 Verdünnung, von NOVEX)		
Reverse Zymographie	2	Gel, aktive MMPs und Gelatine	15µl reverse Zymo Homogen. Puffer (10µl Triton, 500µl Tris-HCl, 5ml Aqua dest.)	8µl Probe, 4µl AK	Siehe MMP Zymographie		
Plasminogen Zymo	3	Gel und Casein	15µl Plasminogen Homogen. Puffer	6µl Probe, 3µl AP	Nach Elpho 1h mit Triton (2%ig) bei RT, Inkubation über Nacht bei 37°C mit Tris/HCl		

8.1.4. Die Aufarbeitung der Proben für die Biochemie

Material/Anwendung	Konzentration	Zeit
Abkratzen der Hirnschnitte mit Unterteilung in Ki, und Kn sowie in Bi und Bn		
Hinzupipettieren des Homogenisierungspuffers	Je nach Methode	
Vortexen		20-30 s
Ultraschallbad		ca. 20-30 s
Abzentrifugieren bei 14.000 U/min		20 min

Anhang

Überstände abnehmen	Für Western Blot, Zymographien und Proteinbestimmung	
Hinzupipettieren des Auftragspuffers	Je nach Methode	
Nur bei Western Blot: Kochen im Wasserbad		5 min
Abzentrifugieren		ca. 1 min
Auftragen der Proben auf das Gel	7.5% SDS	
Start der Elektrophorese zwischen 70V-140V		ca. 1.5-2h

8.1.5. Das Western Blot Protokoll

Material/Anwendung	Konzentration	Zeit
Membran in Semi Dry Anlage		55 min
Ponceau S Färbung		2 min
Entfärben mit Aqua dest.		2 min
Einscannen		
Einlegen in Blockierlösung	1.5% Milchpulver und 3% BSA, pro Blot ca. 50ml	30 min bei RT
Abgießen der Blockierlösung		
Inkubation mit Primär- Antikörper	Je nach Methode, mindestens 5ml pro Blot	über Nacht bei 4°C
Spülen in TBST		3 x 10 min
Inkubation mit Sekundär- Antikörper	Je nach Methode, mindestens 5ml pro Blot	30 min bei RT
Spülen in TBST	10 x TBS: 12,12g Tris, 87,6g NaCl, 1.000ml H ₂ O (pH=7.5) 1xTBST: 100ml 10 x TBS, ad 1l H ₂ O und 800µl Tween 20	3 x 10 min bei RT
Zusatz der Entwicklerlösung (ECL-Kit)	800µl A und 800µl B	2 min
Absaugen der ECL-Lösung		
Membran in Röntgenkassette und Entwicklung		

8.1.6. Das Zymographien Protokoll

Material/Anwendung	Konzentration	Zeit
Inkubation mit Renaturierungspuffer	je nach Methode, 1:10 in Aqua dest.	ca. 1h bei RT
Inkubation mit Reaktivierungspuffer	1:10 in Aqua dest.	mindestens 18h bei 37°C
Fixierung	250ml Methanol 50ml Essigsäure (100%ig) ad 500ml Aqua dest.	30 min bei RT
Coomasie Färbelösung	1 Teil Ethanol (70%ig) 1 Teil Essigsäure (20%ig) je 50ml Lösung 0.25g Coomasie	ca. 1h
Entfärbung	1 Teil Ethanol (70%ig) 1 Teil Essigsäure (20%ig)	methodenabhängig
Einscannen		

8.2. Die Tabellen aus dem Ergebnisteil

8.2.1. Tabelle 3, Licking Test

Licking Test	Anzahl	Wert in %
Kontrolle	6	21,9 ± 14,4
scheinoperiert	4	90,0 ± 6,7
niedrig dosiertes µPli	12	24,1 ± 8,9
moderat bis hoch dosiertes µPli	16	52,5 ± 30,0

Tabelle 3: Prozentabweichungen vom Ausgangswert nach zerebraler Ischämie in Kontroll-, Mikroplasmin- (niedrig dosiert und moderat bis hochdosiert) und scheinoperierten Tieren. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler.

8.2.2. Tabelle 4, Infarktvolumetrie

Gruppe	Infarktvolumen [mm ³]
Kontrolle	167,3 ± 13,2
0,5mg/KG µPli	167,6 ± 41,2
1mg/KG µPli	103,7 ± 25,9
2,5mg/KG µPli	113,6 ± 40,4
5mg/KG µPli	102,0 ± 32,8
10mg/KG µPli	51,0 ± 22,6
p (ANOVA)	0,001

Tabelle 4: Angegeben sind die Infarktvolumina der Kontroll- und jeweiligen Mikroplasmingruppe. Es zeigte sich ein signifikanter (ANOVA $p < 0,001$) Verlauf, in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis. Der größte Unterschied in der Infarktvolumetrie ließ sich zwischen den Kontroll- und den 10mg Mikroplasmintieren (t-Test $p < 0,017$) feststellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

8.2.3. Tabelle 6, Kollagen IV Western Blot

Kollagen Typ IV	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	69 ± 4%		46 ± 5%	
scheinoperiert	98 ± 4%	<0,001	98 ± 1%	<0,001
0,5mg/KG µPli	74 ± 11%	n.s.	79 ± 9%	0,001
1mg/KG µPli	96 ± 4%	0,001	89 ± 11%	0,001
2,5mg/KG µPli	95 ± 3%	0,001	91 ± 5%	0,001
5mg/KG µPli	96 ± 5%	0,001	94 ± 16%	0,005
10mg/KG µPli	94 ± 2%	0,001	86 ± 4%	0,001
p (ANOVA)	0,001		0,001	

Tabelle 6: Kollagen Typ IV Gehalt der zerebralen Mikrogefäße aller Studiengruppen im Kortex und den Basalganglien. Es wurde das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre berechnet. Innerhalb der Mikroplasmingruppen (1mg bis 10mg) konnte ein signifikanter (ANOVA $p < 0,001$) Dosisverlauf im Kortex und den Basalganglien detektiert werden. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler.

8.2.4. Tabelle 7, Hämoglobin Extravasation

Hämoglobin Extravasation	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	191 ±44%		442 ± 124%	
scheinoperiert	127 ±15%	0,038	93 ± 13%	0,010
0,5mg/KG μ Pli	311 ±53%	0,025	286 ± 49%	0,087
1mg/KG μ Pli	297 ±75%	0,042	244 ± 41%	0,047
2,5mg/KG μ Pli	249 ±67%	n.s.	187 ± 25%	0,048
5mg/KG μ Pli	178 ±30%	n.s.	214 ± 35%	0,034
10mg/KG μ Pli	125 ± 5%	0,046	154 ± 24%	0,047
p (ANOVA)	0,001		0,001	

Tabelle 7: Hämoglobin Extravasation aller Gruppen im Kortex und in den Basalganglien. Es konnte ein signifikanter (ANOVA $p < 0,001$) Verlauf innerhalb der Mikroplasmengruppen aufgezeigt werden. Die Werte ergeben sich aus dem Verhältnis des Hämoglobin Gehalts der ischämischen zu nicht-ischämischen Hemisphäre aus den Ergebnissen des Western Blots. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert \pm Standardfehler dar.

8.2.5. Tabellen 8A+B, MMP-2 und MMP-9

MMP-2	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	121 ± 6%		107 ± 4%	
scheinoperiert	99 ± 1 %	n.s.	109 ± 13 %	n.s.
0,5mg/KG µPli	238 ± 98%	n.s.	422 ± 129%	0,002
1mg/KG µPli	181 ± 33%	n.s.	399 ± 76%	0,002
2,5mg/KG µPli	191 ± 39%	0,050	327 ± 44%	0,002
5mg/KG µPli	185 ± 46%	n.s.	289 ± 28%	0,035
10mg/KG µPli	111 ± 10%	n.s.	107 ± 1%	n.s.
p (ANOVA)	0,001		0,001	

MMP-9	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	122 ± 4%		114 ± 5%	
scheinoperiert	97 ± 6%	0,032	99 ± 7%	n.s.
0,5mg/KG µPli	806 ± 152%	0,027	817 ± 217%	0,019
1mg/KG µPli	511 ± 152%	n.s.	732 ± 184%	0,001
2,5mg/KG µPli	251 ± 63%	0,032	491 ± 95%	0,001
5mg/KG µPli	235 ± 51%	n.s.	379 ± 150%	0,004
10mg/KG µPli	119 ± 14%	n.s.	151 ± 21%	0,033
p (ANOVA)	0,008		0,001	

Tabelle 8A+B: Gehalt von MMP-2 und MMP-9 aller Studiengruppen im Kortex und in den Basalganglien. Der Gehalt an MMP-2 und MMP-9 zeigte einen signifikanten dosisabhängigen Verlauf (MMP-2: im Kortex und den Basalganglien (ANOVA $p < 0,001$); MMP-9: im Kortex (ANOVA $p < 0,008$) und in den Basalganglien (ANOVA $p < 0,001$)). Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert ± Standardfehler dar.

8.2.6. Tabellen 9A+B, TIMP-2 und TIMP-1

TIMP-2	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	169 ± 4%		154 ± 22%	
scheinoperiert	103 ± 6 %	0,048	100 ± 15%	n.s.
0,5mg/KG μ Pli	111 ± 5%	n.s.	89 ± 10%	n.s.
1mg/KG μ Pli	99 ± 9%	n.s.	83 ± 7%	n.s.
2,5mg/KG μ Pli	77 ± 5%	0,047	93 ± 5%	n.s.
5mg/KG μ Pli	83 ± 6%	0,040	94 ± 10%	n.s.
10mg/KG μ Pli	136 ± 40%	n.s.	115 ± 9%	n.s.
<i>p</i> (ANOVA)	0,001		0,001	

TIMP-1	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	151 ± 23%		163 ± 19%	
scheinoperiert	92 ± 10%	0,020	97 ± 12%	0,001
0,5mg/KG μ Pli	95 ± 6%	0,031	103 ± 5%	0,011
1mg/KG μ Pli	92 ± 7%	0,015	86 ± 6%	0,005
2,5mg/KG μ Pli	87 ± 5%	0,009	65 ± 6%	0,001
5mg/KG μ Pli	80 ± 7%	0,007	99 ± 8%	0,008
10mg/KG μ Pli	120 ± 39%	n.s.	129 ± 15%	n.s.
<i>p</i> (ANOVA)	0,001		0,001	

Tabelle 9A+B: Gehalt von TIMP-2 und TIMP-1 aller Studiengruppen im Kortex und in den Basalganglien. Es wurde das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Seite (Kortex und Basalganglien) angegeben. Der TIMP konnte durch die unterschiedlichen Mikroplasmindosen nicht signifikant gesteigert werden. Die Werte sind Mittelwert \pm Standardfehler.

8.2.7. Tabellen 10A+B, TIMP-2/MMP-2 und TIMP-1/MMP-9

TIMP-2/MMP-2	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	1,30 ±0,23%		1,56 ± 0,15%	
scheinoperiert	1,12 ±0,11%	0,029	1,00 ± 0,12%	0,001
0,5mg/KG µPli	0,79 ±0,19%	n.s.	0,44 ± 0,19%	0,003
1mg/KG µPli	0,65 ±0,09%	n.s.	0,27 ± 0,60%	0,001
2,5mg/KG µPli	0,60 ±0,14%	n.s.	0,34 ± 0,60%	0,001
5mg/KG µPli	0,64 ±0,15%	n.s.	0,90 ± 0,34%	n.s.
10mg/KG µPli	1,00 ±0,13%	n.s.	1,08 ± 0,10%	0,024
p (ANOVA)	0,001		0,0315	

TIMP-1/MMP-9	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	1,24 ±0,16%		1,38 ± 0,18%	
scheinoperiert	1,02 ±0,08%	0,050	1,11 ± 0,15%	0,017
0,5mg/KG µPli	0,29 ±0,09%	0,001	0,22 ± 0,06%	0,001
1mg/KG µPli	0,42 ±0,15%	0,007	0,12 ± 0,01%	0,002
2,5mg/KG µPli	0,51 ±0,19%	0,021	0,21 ± 0,04%	0,001
5mg/KG µPli	0,95 ±0,25%	n.s.	0,65 ± 0,20%	0,026
10mg/KG µPli	1,02 ±0,16%	n.s.	1,05 ± 0,05%	n.s.
p (ANOVA)	0,012		0,047	

Tabelle 10A+B: TIMP/MMP Verhältnis aller Gruppen im Kortex und in den Basalganglien. Ist der Quotient >1 verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Inhibitoren, bzw. <1 zugunsten der Proteasen. Im Dosisverlauf konnten signifikante Resultate (TIMP-2/MMP-2: im Kortex ANOVA $p < 0,001$ und in den Basalganglien ANOVA $p < 0,05$; TIMP-1/MMP-9 im Kortex ANOVA $p < 0,05$ und in den Basalganglien ANOVA $p < 0,05$) erzielt werden, obwohl das Gleichgewicht auf Seiten der Proteasen lag. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler.

8.2.8. Tabellen 11A+B, t-PA und u-PA

t-PA	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	104 ± 8%		102 ± 12%	
scheinoperiert	95 ± 5 %	n.s.	105 ± 1%	n.s.
0,5mg/KG µPli	80 ± 25%	n.s.	110 ± 19%	n.s.
1mg/KG µPli	80 ± 11%	n.s.	100 ± 13%	n.s.
2,5mg/KG µPli	73 ± 14%	0,019	98 ± 33%	n.s.
5mg/KG µPli	89 ± 6%	n.s.	101 ± 18%	n.s.
10mg/KG µPli	103 ± 6%	n.s.	93 ± 6%	n.s.
<i>p</i> (ANOVA)	0,001		0,001	

u-PA	Kortex	t-Test	Basalganglien	t-Test
Kontrolle	171 ± 20%		1019 ± 226%	
scheinoperiert	94 ± 7%	0,002	97 ± 8 %	0,001
0,5mg/KG µPli	347 ± 176%	0,001	939 ± 275%	n.s.
1mg/KG µPli	584 ± 256%	0,035	1126 ± 129%	n.s.
2,5mg/KG µPli	606 ± 340%	0,039	1195 ± 463%	n.s.
5mg/KG µPli	604 ± 256%	0,021	964 ± 159%	n.s.
10mg/KG µPli	159 ± 42%	n.s.	917 ± 237%	n.s.
<i>p</i> (ANOVA)	0,007		0,001	

Tabelle 11A+B: Expression der beiden Plasminogen-Aktivatoren t-PA und u-PA aller Studiengruppen im Kortex und in den Basalganglien. Die Lysezonen der Zymographien wurden quantifiziert und das Verhältnis von ischämischer zu nicht-ischämischer Hemisphäre berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwert ± Standardfehler.

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die exzellente Betreuung, die Anregung, die Hilfe und Unterstützung der folgenden Personen nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G.F. Hamann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit in seinem Labor für experimentelle Schlaganfallforschung auch über die Grenzen von München hinaus und die exzellente Betreuung bedanken.

Des Weiteren gilt mein außerordentlicher Dank der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Dr. Dorothe Burggraf. Durch sie wurde mir die Möglichkeit geboten, die ersten Schritte in das weite und spannende Gebiet der experimentellen Schlaganfallforschung zu gehen und mich als „Wissenschaftlerin“ zu entfalten. Ich danke Ihr besonders für die hervorragende Betreuung und Unterstützung (auch während langer „Durststrecken“), die Ausarbeitung meines immer noch sehr reizvollen Themas, und für alle anderen studentischen Belange.

Mein nächster Dank geht an die Mitbetreuer meiner Dissertation. Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Andreas Trinkl bedanken, der mein Dissertationsthema ausgeschrieben hat und bei dem ich mein Vorstellungsgespräch hatte. Danke für die schönen Laborstunden. Außerdem noch ein großes Dankeschön an alle weiteren Laborkolleginnen und -kollegen für die vielfältigen und bereitwilligen Hilfen, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit im Labor.

Auf privater Seite möchte ich mich bei meinen Eltern, Uli und Günter Schubert, bedanken, die mich zu dem Menschen erzogen haben der ich bin und ohne deren vielfältige Unterstützung in allen Bereichen, ich mit Sicherheit nie soweit gekommen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei meiner Schwester Angela Schubert bedanken. Sie hat nicht nur diese Arbeit Korrektur gelesen, sondern ist immer für mich da, wenn ich sie brauche.

Dann möchte ich mich sehr herzlich bei meinen Großeltern, Ruth und Andreas Wender, bedanken. Sie haben mich immer unterstützt und ermutigt.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Katrin Pöttinger bedanken, die mir durch ihre vielfältigen und perfekten Designer Kenntnisse stets zur Seite stand und mir viele Tipps für Gestaltung meine Abbildungen geben konnte.

Der abschließende Dank geht an meinen Freund Thomas Pöttinger, der während der ganzen letzten Zeit immer für mich da war und auch in unseren privaten Räumen Ansprech- und Diskussionspartner über diverse Labor- und Studienprobleme war. Er hat mich stets unterstützt, motiviert und bringt mich immer zum Lachen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marion Schubert
Geburtsdatum	27.08.1981
Geburtsort	Ulm
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1988-1992	Grundschule an der Südlichen Auffahrtsallee, München
1992-2001	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München
2001	Abitur
2001-2002	Oakland's Collage, St. Albans, England

Hochschulstudium

ab 2002	Humanmedizin Ludwig-Maximilians-Universität, München
2004	Ärztliche Vorprüfung
2008	Staatsexamen Humanmedizin

Ärztliche Tätigkeit

seit 03/2009	Assistenzärztin, Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München. Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Klopstock
--------------	--

Wissenschaftliche Tätigkeiten

2005	Posterpräsentation: „Microplasmin reduces microvascular damage and blood brain barrier disruption following experimental stroke“. 78. Kongress der deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie, Wiesbaden
2007	Posterpräsentation: „Dose-dependent Microplasmin reduces microvascular basal lamina damage and blood brain disruption in experimental focal cerebral ischemia“. The 23 rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain '07) and the 8 th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (BrainPET'07), Osaka, Japan

Stipendium

2007	Stipendiat der Glaxo-Smith Kline Stiftung
------	---