

**Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl**

**Rolle von Thrombozyten für die Schädigung von
Neuronen nach fokaler zerebraler Ischämie**

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

vorgelegt von
Sebastian Malte Sonanini
aus München
2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard F. Becker
Priv. Doz. Dr. Uwe Koedel**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Seong Woong Kim**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR**

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

**Meinen Eltern
Meinem Bruder**

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	3
1.1 Klinische Aspekte der zerebralen Ischämie	3
1.1.1 Definition	3
1.1.2 Epidemiologie	3
1.1.3 Pathophysiologie.....	4
1.1.3.1 Ischämischer neuronaler Schaden.....	4
1.1.3.2 Reperfusionsschaden.....	5
1.1.3.3 Bedeutung intravaskulärer Zellen für den neuronalen Zelltod	6
1.1.4 Therapiemöglichkeiten	11
1.1.4.1 Klinisch etablierte Therapie des Schlaganfalls.....	11
1.1.4.2 Experimentelle Behandlungsmöglichkeiten: Ergebnisse in der Klinik.....	12
1.2 Ziele der Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Allgemeine Maßnahmen	14
2.2 Versuchstiere	14
2.3 Anästhesie	14
2.3.1 Anästhetika	14
2.3.2 Beatmung.....	15
2.3.3 Körpertemperatur.....	16
2.4 Blutdruckmessung.....	16
2.5 Zerebrale Durchblutung.....	17
2.6 Okklusion der A. cerebri media	17
2.7 Intravitalmikroskopie.....	19
2.7.1 Prinzip der Epiillumination.....	19
2.7.2 Aufbau des Intravitalmikroskops.....	19
2.7.3 Präparation zur Intravitalmikroskopie	21
2.7.4 Thrombozyten-Endothelinteraktion.....	21
2.8 Blutungszeit.....	22
2.9 Thrombozytenzählung.....	22
2.10 Thrombozytendepletion: GPIIb/IIIa-Antikörper.....	22
2.11 Neurologischer Befund.....	23
2.12 Histologie	24

2.12.1 Gefrierschnitte.....	24
2.12.2 Paraffinschnitte	24
2.13 Versuchsgruppen und Protokolle.....	25
2.13.1 MCAO Standardisierung	25
2.13.2 Thrombozytenisolierung und -anfärbung	25
2.13.3 Intravitalmikroskopie	26
2.13.4 GPIb α -Antikörper Physiologie	27
2.13.5 MCAO und GPIb α -Inhibition.....	27
2.14 Statistische Auswertung	28
3 ERGEBNISSE.....	29
3.1 MCAO-Standardisierung	29
3.1.1 Zerebrale Durchblutung.....	29
3.1.2 Infarkt volumen.....	30
3.2 Thrombozyten Endothelinteraktion	31
3.2.1 Vitalparameter.....	31
3.2.2 Venöses Gefäßbett	32
3.2.3 Arteriell es Gefäßbett	33
3.2.4 Depletion und Thrombozyten-Endothel-Interaktionen.....	35
3.3 MCAO unter Depletion	36
3.3.1 Thrombozytendepletion und Blutungszeit.....	36
3.3.2 Neurologische Folgen	36
3.3.3 Infarkt volumen und intrazerebrale Blutung	40
3.3.4 Neuronaler Zelltod.....	41
4 DISKUSSION.....	44
4.1 Diskussion der Methoden	44
4.1.1 Experimentelle fokale zerebrale Ischämie	44
4.1.2 Anästhesie	47
4.1.2.1 Neuroprotektive Effekte	47
4.1.2.2 Körpertemperatur	48
4.1.3 Thrombozytenpräparation	48
4.1.4 Intravitalmikroskopie	49
4.1.5 Thrombozytendepletion.....	50
4.1.6 Neurologische Evaluation.....	50
4.2 Thrombozyten und zerebraler Reperfusionsschaden	51
4.2.1 Thrombozyten-Endothelinteraktion nach zerebraler Ischämie	51
4.2.2 Funktionelle und histologische Evaluation nach MCAO und Depletion.....	52
4.2.3 Bedeutung von PEI, LEI und GPIb für den neuronalen Zelltod	53

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	57
ZUSAMMENFASSUNG.....	60
REFERENZEN	62
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	70
DANKSAGUNG.....	72
LEBENS LAUF	73

Einleitung

1.1 Klinische Aspekte der zerebralen Ischämie

1.1.1 Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert den Schlaganfall als sich schnell entwickelnde Symptome fokaler oder globaler neurologischer Ausfälle mit offensichtlicher vaskulärer Genese, die mindestens 24 h anhalten oder letal enden (WHO MONICA Project, 1988).

1.1.2 Epidemiologie

Jedes Jahr erleiden in den USA ca. 780.000 Patienten einen neuen (ca. 600.000) oder rezidivierenden (ca. 180.000) Schlaganfall. Bei Patienten unter 75 Jahren sind mehr Männer als Frauen betroffen ($\frac{\text{♂}}{\text{♀}} = 1,50$; 65 bis 74 a). Durch die höhere Lebenserwartung von Frauen erkranken diese im Alter von ≥ 85 a deutlich häufiger ($\frac{\text{♂}}{\text{♀}} = 0,76$; ≥ 85 a). In den westlichen Industrienationen sind zerebrovaskuläre Erkrankungen, nach kardiovaskulären und malignen Tumorerkrankungen, die dritthäufigste Todesursache, so dass im Durchschnitt etwa alle 3 bis 4 Minuten ein Patient an einem zerebralen Insult verstirbt. Im Jahr 2004 lag die absolute Todesrate bei 50/100.000 Einwohnern, davon waren 61% Frauen. Etwa 8 - 12% der Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall versterben innerhalb der ersten 30 Tage. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei beiden Geschlechtern im Alter von > 70 a bei ca. 48%, im selben Zeitraum erleiden etwa 25% der Patienten ein Rezidiv. Zwischen 50 und 70% der Patienten erholen sich wieder vollständig, aber 15 bis 30% leben danach mit einer permanenten Behinderung und ca. 20% sind auf pflegerische Hilfe rund um die Uhr angewiesen. 2008 verursachten zerebrovaskuläre Erkrankungen etwa $65,5 \times 10^9$ US-\$ an direkten und indirekten Kosten (Rosamond et al., 2008).

1.1.3 Pathophysiologie

1.1.3.1 Ischämischer neuronaler Schaden

Die WHO-Definition beinhaltet auch die hämorrhagischen Formen, allerdings entstehen etwa 87% aller Schlaganfälle durch eine Okklusion der hirnversorgenden Gefäße mit der Folge einer fokalen oder globalen zerebralen Ischämie (Rosamond et al., 2008). Das Gehirn macht nur etwa 2% des Körpergewichts aus, benötigt aber zwischen 15 und 20% des Herz-Minuten-Volumen (HMV). Durch die reduzierte zerebrale Durchblutung (<18 ml/100 mg/min) kommt es im Kerngebiet der vom okkludierten Gefäß versorgten Region zu irreversiblen Nekrosen und apoptotischem Zelltod. Diese entstehen durch Sauerstoff- und Glukoseentzug, Depolarisierung neuronaler Zellen und Ca²⁺ vermittelter Toxizität. Um diesen ischämischen Kern liegt eine Region, die von Kollateralkreisläufen versorgt wird, elektrophysiologisch zwar keine Aktivität zeigt, aber potenziell durch revaskulierende und neuroprotektive Maßnahmen noch zu retten wäre, da in der Frühphase noch keine nekrotischen Veränderungen auftreten. Dieses Gebiet bezeichnet man als Penumbra. In den weiteren Stunden und Tagen wird die Perfusion des Gehirns durch ein sich ausbildendes Hirnödem weiter beeinträchtigt. Tabelle 1 zeigt die häufigsten Ursachen und die entsprechenden experimentellen Modelle des Schlaganfalls:

Form	Pathophysiologie	Gefäßaffektion	Tiermodell
thrombotisch	Atherosklerose	große intra- und extrakranielle Gefäße: ICA, VA, PCA, A. subclavia	MCAO* (permanent oder transient)
	Arterielle Hypertonie	Intrakranielle Gefäße: MCA, ACA, AChA, PCA, BA	
	Trauma	A. carotis, VA	?
embolisch	Kardial, arterioarteriell (Aorta, Karotis, A. vertebralis)	Je nach Größe des Embolus: große extrakranielle Gefäße, MCA, VA, distale BA, PCA	MCAO* (permanent oder transient)
systemische Hypotension	Herzinfarkt, HRST, Blutverlust	Grenzzoneninfarkt	Modelle zur globalen zerebralen Ischämie

* meist durch intraluminale Fäden, Thromboembolien oder Elektrokoagulation verursacht

Tabelle 1: häufige Formen des ischämischen Schlaganfalls und entsprechende Tiermodelle; ICA: A. carotis interna, VA: A. vertebralis, PCA: A. cerebri posterior, MCA: A. cerebri media, ACA: A. cerebri anterior, AChA: A. choroidea anterior, BA: A. basilaris, MCAO: Okklusion der MCA; HRST: Herzrhythmusstörungen; nach (Willing, 2008)

1.1.3.2 Reperfusionsschaden

Eine Ischämie führt zu Gewebeschäden. Erstaunlicherweise verursacht auch die Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung unter Umständen zusätzlichen Schaden. Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet. Erste Hinweise dafür fanden sich in den 1960er Jahren, als bekannt wurde, dass die Wiederherstellung der Durchblutung nach langem Abklemmen großer Arterien zu systemischem Schock und Azidose führen kann (Baue, 1965; Vetto and Brant, 1968). Die Rekanalisation des okkludierten Gefäßes innerhalb eines Zeitfensters von 3 bis 6 h ist das Ziel aller kausalen therapeutischen Möglichkeiten nach ischämischem Schlaganfall (Thrombolyse oder Embolektomie, siehe 1.1.4). Trotz zeitgerechter Wiedereröffnung des Gefäßes können Patienten eine progrediente neurologische Symptomatik zeigen. Somit garantieren die zurzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten, weder in jedem Fall einen vollständigen Schutz vor einer Ausbreitung der Nekrose, noch eine spätere Rekonvaleszenz. Neben der postischämischen Hyperperfusion und dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, spielen in diesem Zusammenhang auch Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI), Leukozyteninvasion in das Parenchym und die Aktivierung von Thrombozyten und Komplementfaktoren, eine pathophysiologisch wichtige Rolle (Pan et al., 2007).

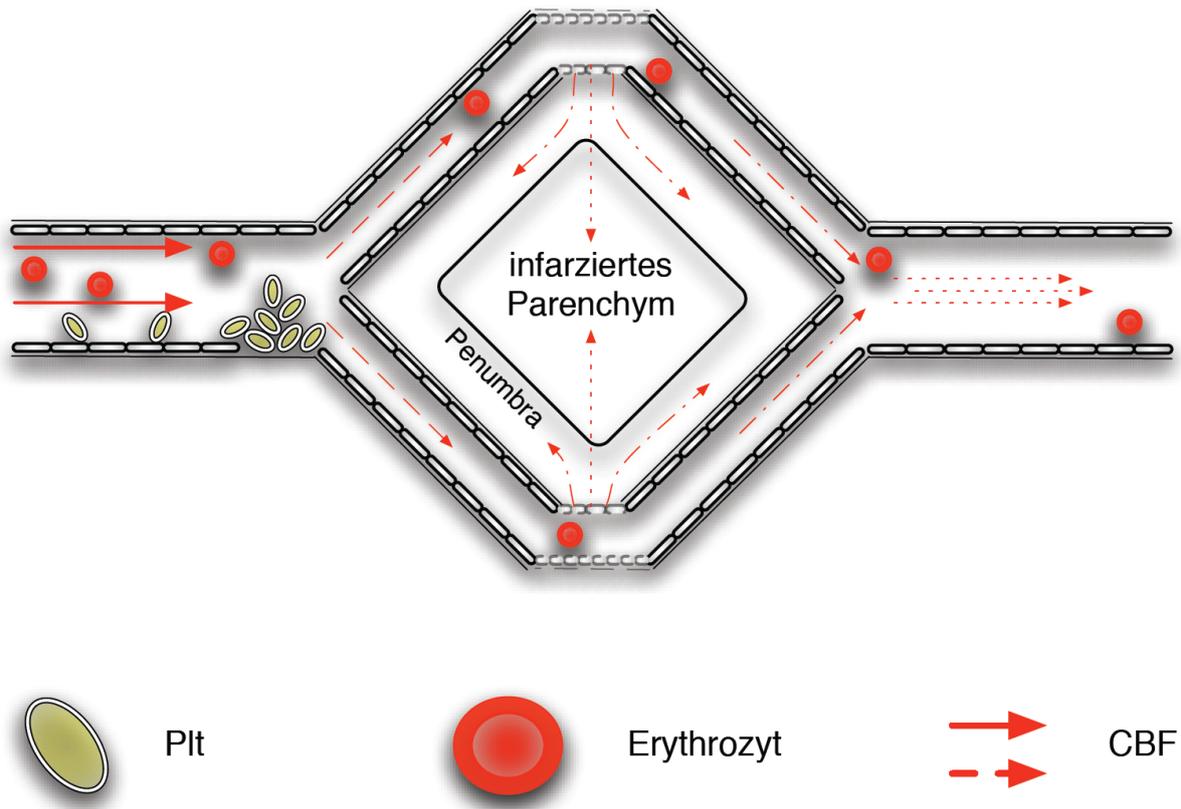


Abbildung 1: Schema eines ischämischen Schlaganfalls, Die Arterie ist von einem Thrombus verlegt, die zerebrale Durchblutung (CBF) fällt im nachgeschalteten Stromgebiet ab. Parenchym, das keine Kollateralen aufweist infarziert – die Penumbra als potentiell zu rettendes Gewebe umgibt den nekrotischen Kern.

1.1.3.3 Bedeutung intravaskulärer Zellen für den neuronalen Zelltod

Thrombozyten spielen klassischerweise eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Blutgerinnung: einerseits unter physiologischen Bedingungen, andererseits nach Verletzungen der Gefäßwand, die zu einer Freilegung der subendothelialen Matrix führen. Zwei Adhäsionsrezeptoren, Glykoprotein (GP) Ib-IX-V und GPVI binden jeweils von Willebrand Faktor (Kuijpers et al., 2004) und Kollagen, was zur initialen Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten führt (Kroll et al., 1996; Nieswandt and Watson, 2003; Andrews and Berndt, 2004). Beim Menschen ist ein Fehlen oder eine gestörte Funktion von GPIb-IX-V als Bernard-Soulier-Syndrom, eine kongenitale Blutungsstörung, bekannt. Die Patienten zeigen milde Thrombozytopenien, große, inadhärente Thrombozyten und eine dramatisch verlängerte Blutungszeit (Lopez et al., 1998). Die Adhäsion der Thrombozyten führt neben einer steigenden zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu Veränderungen des Zytoskeletts. Diese gehen mit Translokation und Aktivierung von Integrinen an der Zelloberfläche einher und

unterstützen damit die Adhäsion und Aktivierung weiterer Thrombozyten. Dabei ist GPIIb/IIIa (α IIb β 3) das wichtigste Integrin. Es bindet vWF und Fibrinogen und vermittelt damit die Aggregation der Thrombozyten unter Tangentialspannung (engl. shear stress) (Kroll et al., 1996; Xiong et al., 2003). Allerdings kann der Ausfall von GPIIb/IIIa auch durch andere Integrine kompensiert und so die Aggregation von Thrombozyten weiter unterstützt werden (Goto et al., 2002; Gruner et al., 2003; Siljander et al., 2004). Aggregierende, aktivierte Thrombozyten und der Thrombus selbst beschleunigen die Gerinnungskaskade weiter, was letztendlich zur fibrinvermittelten Stabilisierung des Koagels und dessen GPIIb/IIIa-abhängigen Kontraktion führt.

Neben der beschriebenen Funktion der Thrombozyten im Rahmen der physiologischen Hämostase, führt die gleiche Abfolge von Interaktionen unter pathologischen Bedingungen zu thrombotischen Erkrankungen, wie dem akuten Koronarsyndrom und dem ischämischen Schlaganfall. So kann eine rupturierte Atherosklerose-Plaques die subendotheliale Matrix freilegen oder pathologisch veränderte Tangentialspannungen in okkludierten Arterien Adhäsion, Aggregation und Aktivierung von Thrombozyten fördern. Der entstandene Thrombus blockiert dann die Blutversorgung von Herz oder Gehirn (Kroll et al., 1996; Bhatt and Topol, 2003; Gawaz, 2004). Die adhären und aktivierten Thrombozyten interagieren weiterhin mit zirkulierenden Leukozyten und unterstützen die PLEI. Auch hier spielen wiederum thromboseregulierende Rezeptoren eine Rolle (Weyrich et al., 2003). Thrombozyten sollen so die Interaktion inflammatorischer Leukozyten mit der Gefäßwand fördern (Massberg et al., 2002).

Die Rolle von Leukozyten in der Pathogenese des Reperfusionsschadens nach Ischämie in unterschiedlichen Organen wird bereits in einigen Arbeiten beschrieben (Engler et al., 1983; Hartl et al., 1996; Ishikawa et al., 2004; Ishikawa et al., 2005). So soll es zu Infiltration von Leukozyten in das ischämische Hirnparenchym sowohl beim Menschen, als auch in tierexperimentellen Schlaganfallmodellen kommen (Pozzilli et al., 1985; Hallenbeck et al., 1986; del Zoppo et al., 1991; Akopov et al., 1996). Durch experimentelle antileukozytäre Interventionen konnte außerdem der neuronale Zelltod und das Infarktvolume verringert werden (Connolly, Jr. et al., 1996; Kitagawa et al., 1998; Shimakura et al., 2000). Von zentraler Bedeutung für das Verständnis des leukozytär vermittelten neuronalen Zelltodes ist die Vorstellung eines mehrschrittigen Prozesses: nach der Adhäsion von Leukozyten an das

Endothel, transmigrieren diese in das Parenchym und induzieren über zytotoxische Substanzen, wie z.B. freie Sauerstoffradikale den neuronalen Zelltod (Kochanek and Hallenbeck, 1992; Hartl et al., 1996; Ishikawa et al., 2004). Diese Überlegungen müssen jedoch durch Studien ergänzt werden, die zeigen, dass Leukozyten in den meisten Fällen das ischämische Parenchym erst nach Beginn des Zelluntergangs infiltrieren (Clark et al., 1993; Zhang et al., 1994; Garcia et al., 1994; Hayward et al., 1996). Diese und eigene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Kataoka et al., 2004; Kataoka et al., 2005) lassen den Schluss zu, dass die Invasion von Leukozyten nicht im vollen, zuvor angenommenen Ausmaß am neuronalen Zelltod beteiligt ist. Allerdings konnten LEI früh genug beobachtet werden, um eine mögliche kausale Rolle dabei zu spielen. Über CD18-Antikörper konnten wir zeigen, dass LEI um bis zu 60% gehemmt werden. Dies führte gleichzeitig zu einer Verdreifachung der überlebenden Neuronen, während die Anzahl der eingewanderten Leukozyten im infarzierten Parenchym unverändert blieb. Somit wurde postuliert, dass bisher unbekannte transendotheliale Signalwege für den neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie verantwortlich sein könnten.

Neben den Leukozyten interagieren aber auch andere intravaskuläre Zellen mit dem Endothel. In den letzten Jahren wurden Thrombozyten und deren Adhäsionsmolekülen eine immer größere Rolle als zweite pro-inflammatorische Zellpopulation zugesprochen (Weyrich and Zimmerman, 2004; Zarbock et al., 2007). Wie oben beschrieben interagieren Thrombozyten nicht nur mit dem Endothel selbst, sondern unter anderem auch über thrombozytäres P-Selektin mit leukozytärem PSGL-1 und GPIIb α mit Mac-1 (Romo et al., 1999). Abbildung 2 zeigt ein Schema der Thrombozyten Adhäsion, Aktivierung und Aggregation.

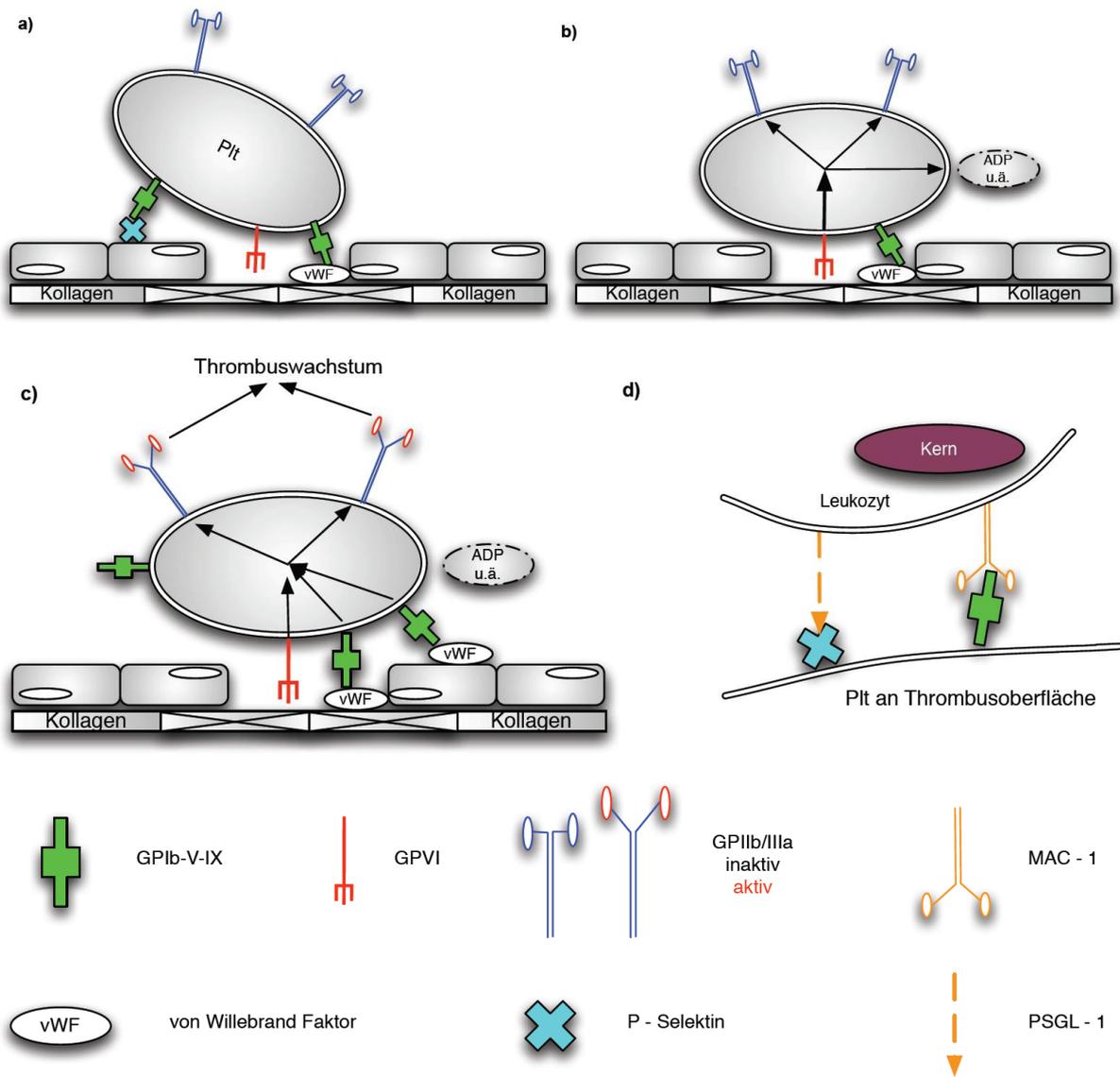


Abbildung 2: Schema der Thrombozyten-Endothelinteraktion. a) Der initiale Kontakt (rolling) zwischen Thrombozyten und der extrazellulären Matrix tritt vor allem unter hohen Tangentialspannungen via GPIb-vWF-Interaktionen auf. Gleichzeitig interagiert GPIb aber auch mit endotheliale P-Selektin. b) Nach Verletzungen des Endothels aktiviert GPVI über seine Bindung mit Kollagen den Thrombozyten und es kommt zur Ausschüttung weiterer Agonisten wie ADP oder Thromboxan A₂. Unterstützt wird die Aktivierung wiederum durch GPIb. c) Die feste Adhärenz und Aggregation des Thrombus wird von jetzt aktiviertem GPIIb/IIIa über Bindungen mit vWF und Fibrinogen in Gang gesetzt. Auch die sezernierten Agonisten unterstützen diesen Vorgang – der Thrombus wächst. d) Adhärente Thrombozyten interagieren auch mit Leukozyten und können so die Immunantwort der Leukozyten modulieren. Modifiziert nach (Stoll et al., 2008).

Wie nachfolgend beschrieben, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen tierexperimentell ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten und deren Rezeptor-Liganden-Interaktionen, sowie zerebralen ischämischen Ereignissen aufgedeckt werden. Mit radioaktivem ¹¹¹In markierte Thrombozyten lagerten sich entlang ischämisch veränderter Glia während der frühen Reperfusion nach Okklusion der A. cerebri media (MCAO) bei Primaten ab. Paviane, die mit Ticlopidin und Heparin

behandelt wurden, zeigten signifikant weniger Thrombozytenanlagerungen und mikrovaskuläre Okklusionen in den ischämischen Basalganglien (del Zoppo, 1998). Bei GPIIb^{-/-} Mäusen konnten PEI in der A. carotis nach Ischämie deutlich gesenkt werden, gleichzeitig zeigten die Tiere signifikant kleinere Infarkt volumina nach MCAO gegenüber Wildtypen (Massberg et al., 2005). Nachweise von PEI mittels intravitalmikroskopischen Untersuchungen des zerebralen Gefäßbettes finden sich hingegen nur wenige. So konnten 4 h nach bilateraler Okklusion der A. carotis communis, im Vergleich zur 40-Minuten-Gruppe signifikant mehr rollende und adhärenzte Thrombozyten und Leukozyten in kortikalen Venen beobachtet werden. P-Selektin^{-/-} und ICAM-1^{-/-} Mäuse zeigten deutlich weniger Interaktionen der einzelnen Zellpopulationen mit dem Endothel (Ishikawa et al., 2003).

Fibrin- und Thrombozyten-Ansammlungen sowie Infarkt volumina konnten dosisabhängig durch einen GPIIb/IIIa Antagonisten verkleinert werden. Allerdings zeigte sich bei höheren Dosen auch eine höhere Blutungsrate (Choudhri et al., 1998; Kleinschnitz et al., 2007). Kleinschnitz et al. konnten zeigen, dass neben der Inhibition von GPIIb/IIIa auch die Inhibition von GPIb mittels Antikörpern das Infarkt volumen nach zerebraler Ischämie in Mäusen signifikant senken und gleichzeitig die neurologische Symptomatik verbessern kann (Kleinschnitz et al., 2007). Hier wurde bei der Verwendung des GPIb-Antikörpers auch die Abwesenheit von intrazerebralen Blutungen unterstrichen.

Daneben werden PEI in extrakraniellen Organen, wie dem Intestinaltrakt, dem Herzen oder der Muskulatur nach Ischämie/Reperfusion mittels intravitalmikroskopischen Untersuchungen beschrieben. So konnte z.B. durch monoklonale Antikörper gegen P-Selektin die Anzahl rollender und adhärenzter Thrombozyten und Leukozyten nach intestinaler Ischämie signifikant reduziert werden (Massberg et al., 1998).

1.1.4 Therapiemöglichkeiten

1.1.4.1 Klinisch etablierte Therapie des Schlaganfalls

Trotz der hohen Mortalität und Morbidität ischämischer Schlaganfälle, gibt es nur äußerst begrenzte Therapiemöglichkeiten.

Richtlinien für die Behandlung der verschiedenen Schlaganfallformen werden von den Fachgesellschaften (z.B. American Stroke Association, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie) in regelmäßigen Abständen veröffentlicht (Adams, Jr. et al., 2007). Von zentraler Bedeutung für Therapie und Prognose des Patienten ist vor allem die zügige und eindeutige Unterscheidung zwischen ischämischem oder hämorrhagischem Infarkt.

Seit 1996 gilt die intravenöse Thrombolyse für den akuten ischämischen Schlaganfall mittels rekombinantem Gewebefibrinolyse (Toni et al., 2005) als Therapie der Wahl (Lyden, 2005). Die Prognose des Patienten kann durch die Revaskularisierung innerhalb von 4,5 h nach Symptombeginn verbessert werden – bei einer Lyse innerhalb von 90 Minuten konnten die neurologischen Residuen reduziert werden. Zwischen 90 und 180 Minuten lag das Quotenverhältnis (OR; *engl. odds ratio*) immer noch bei 1,69 (95%-CI: 1,09 – 2,62) (NINDS, 1995). Nach 270 Minuten konnte kein signifikant positiver Effekt der Revaskularisierung beobachtet werden. Die Ergebnisse der Therapie sind also um so besser, je früher diese einsetzt (Marler et al., 2000).

Eine andere Therapieoption ist der seit 2004 von der FDA zugelassene „MERC1 Retriever[®]“ (Concentric Medical, CA, USA) zur endovaskulären Entfernung thrombotischen Materials bei Patienten die eine i.v. Lyse ablehnen oder bei denen diese kontraindiziert ist (Smith et al., 2005; Smith, 2006). Das Risiko symptomatischer intrazerebraler Blutungen ist bei beiden Verfahren ähnlich (Hacke et al., 2004; Smith et al., 2005; IMS II Study, 2007). Dazu kommen die speziellen Komplikationen aller interventionellen i.a. Verfahren, wie Blutungen nach Punktion der A. femoralis (1 – 3% d.F.), Gefäßverletzungen und –spasmen, sowie Verschleppung des thrombotischen Materials (Smith et al., 2005; Lutsep, 2006; IMS II Study, 2007). Selbst die alleinige Verwendung von Kontrastmittel soll bereits mit einem höheren Blutungsrisiko assoziiert sein (Khatri et al., 2007).

Letztendlich konzentriert sich die Behandlung jedoch immer noch auf präventive Maßnahmen zur Verhütung eines Erst- oder Zweitinfarktes und auf die Rehabilitation nach einem ischämischen Ereignis. Dafür stehen Thrombozyteninhibitoren

(Acetylsalicylsäure, Dipyridamol, Clopidogrel und Telmisartan) und Antikoagulantien (z.B. Warfarin) zur Verfügung. Mit Blick auf die antithrombozytäre Therapie wurden insgesamt vier große Studien durchgeführt (CAPRIE, ESPS-2, MATCH und PProFESS). Ein klarer Vorteil für eine der oben genannten Substanzen konnte dabei jedoch nicht nachgewiesen werden (Selim, 2008). Weiterhin tragen leider all diese Substanzen ein gewisses Risiko für symptomatische intrazerebrale Blutungen. Daneben gibt es nur einige mehr oder weniger erfolgreiche Versuche, experimentelle Ergebnisse zur Neuroprotektion in klinischen Studien zu bestätigen (siehe unten).

1.1.4.2 Experimentelle Behandlungsmöglichkeiten: Ergebnisse in der Klinik

Betrachtet man alle klinischen Studien zur Therapie und vor allem zur Prävention zerebraler ischämischer Ereignisse, so überwiegen deutlich thrombolytische und antithrombotische Ansätze über die neuroprotektiven (Internet Stroke Center, 2007). Präklinische experimentelle Studien zeigen, dass Neuroprotektion durch unterschiedlichste Maßnahmen (z.B. milde Hypothermie, Bradykinin- und Vasopressin-Antagonisten, hochdosiertes Albumin u.v.m.) zu einer hochgradigen Reduktion des ischämischen Hirnschadens führen und somit prinzipiell möglich sind (Zausinger et al., 2003a; Zausinger et al., 2003b; Vakili et al., 2005; Ginsberg, 2008b).

Obwohl in manchen Studien die Nekrose um mehr als 70% verkleinert werden konnte (Ginsberg, 2008a), zeigten andere lediglich eine Reduktion von $31 \pm 19\%$ (O'Collins et al., 2006). Dies gibt die große Variabilität präklinischer Versuche in ihrer Quantität und Qualität wieder. Von den bis Ende 2007 durchgeführten klinischen Studien zur Neuroprotektion ($n \approx 160$) wurden nur etwa 40 als groß angelegte Studien tatsächlich beendet. Die Hälfte davon überschritt allerdings das 6 h Fenster (12, 24 oder 48 h) nach dem ischämischen Ereignis (Ginsberg, 2008a). Präklinische Daten zeigten wiederholt, dass neuroprotektive Massnahmen – zumindest bei Nagetieren - nur innerhalb von 6 h nach dem Schlaganfall sinnvoll sind.

1.2 Ziele der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Thrombozyten am post-ischämischen Hirnschaden kausal beteiligt sind. Grundlage hierfür waren frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Rolle von Leukozyten am Reperfusionsschaden nach zerebraler Ischämie (Kataoka et al., 2004). Die vorliegende Studie wurde dazu in mehrere Teile aufgeteilt:

1. Visualisierung und Quantifizierung der PEI zu verschiedenen Zeitpunkten nach zerebraler Ischämie.
2. Korrelation der PEI mit dem neuronalen Zelltod um zu klären, ob Thrombozyten prinzipiell am neuronalen Zelltod beteiligt sind.
3. Selektive Hemmung der Thrombozytenadhäsion über einen GPIIb/IIIa – Antikörper mit histologischer und neurologischer Evaluation zu verschiedenen Zeitpunkten nach zerebraler Ischämie.

2 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von 2005 bis 2008 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

2.1 Allgemeine Maßnahmen

Alle Versuchstiere wurden den verschiedenen Gruppen zufällig zugeordnet. Die abschließende Auswertung histomorphologischer Veränderungen, neurologischer Befunde und der in der Intravitalmikroskopie (IVM) erhobenen Daten erfolgte verblindet. Vorhandene Zusammenhänge zu einzelnen Gruppen wurden erst nach der abschließenden statistischen Analyse der Daten aufgezeigt.

2.2 Versuchstiere

Für diese Studie wurden männliche C57/BL6 Mäuse mit einem Gewicht von 18 bis 22 g verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Alle Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden einem physiologischen Tag-Nacht Zyklus ausgesetzt. Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien der LMU München und der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag 48-03).

2.3 Anästhesie

2.3.1 Anästhetika

Für Versuche mit einer OP-Zeit von weniger als 45 Minuten wurde auf volatile Anästhetika zurückgegriffen. Zur Einleitung verwendeten wir 4% Isofluran, welchem die Tiere für 2 Minuten in einer entsprechenden Kammer ausgesetzt wurden. Die Narkose wurde dann mit 2% Isofluran, 30% O₂ und 68% N₂O über eine Gesichtsmaske aufrechterhalten.

Für längere Experimente erfolgte die anästhesiologische Versorgung der Tiere mit einer intraperitoneal verabreichten Injektionsnarkose. Auch hier erfolgte die

Einleitung mit 4% Isofluran, danach wurde die aus drei Medikamenten bestehende Kombinationsnarkose gewichtsadaptiert appliziert:

Um eine entsprechende Toleranz gegenüber chirurgischer Präparationen zu erreichen, erfolgte die Anästhesie mit Midazolam (5 mg/kg KG, Dormicum®, Roche). Zur Analgesie kam zusätzlich Fentanyl (0,05 mg/kg KG, Janssen-Cilag) als kurzwirksamer akkumulierender μ -Opioid-Rezeptor-Agonist mit stark analgesierenden Eigenschaften hinzu. Außerdem verwendeten wir zur weiteren Sedierung Medetomidin (0,5 mg/kg KG, Pfizer), ein α_2 -Adrenozeptor-Agonist mit schwacher analgetischer Potenz. Der Vorteil dieser Kombinationsnarkose liegt darin, dass die Narkose durch Gabe von Antagonisten beendet werden kann und zu keiner Steigerung der zerebralen Durchblutung führt. Dadurch können neuroprotektive Effekte wie bei einer lang andauernden Inhalationsnarkose, vermieden werden (Thal and Plesnila, 2007).

Die Narkose konnte durch wiederholte Injektion der halben Ausgangsdosis aufrechterhalten werden. Da diese Kombinationsnarkose deutlich atemdepressiv wirkt, war eine Intubation und maschinelle Beatmung der Tiere notwendig.

Um einer Dehydratation der Tiere durch die verwendeten trockenen Atemgase vorzubeugen, wurde ihnen 0,4 ml 0,9% NaCl/h i.v. verabreicht.

2.3.2 Beatmung

Für Experimente die einen Zeitraum von 45 Minuten überschritten, war eine orotracheale Intubation und maschinelle Beatmung nötig. Hierfür wurde eine handelsübliche Braunüle auf 22 mm verkürzt (20 G, Johnson & Johnson), als Trokar diente die etwa auf 23 mm gekürzte Punktionskanüle. Die Intubation erfolgte unter Sicht mit einem chirurgischen Mikroskop (OpMi – 1, Carl Zeiss, Jena). Tubus und Beatmungsmaschine wurden mit einem Y – Adapter verbunden, wozu das proximale Verbindungsstück der Braunüle auf ca. 4 mm gekürzt werden musste. Zur Befestigung einer Mikrokapnometersonde wurde in diesem Bereich ein Loch gebohrt. Die Tiere wurden mit 30% O₂ und 70% N₂O in einem Inhalations/Exhalationsverhältnis (I/E) von 1:1 (Minivent 845, Hugo Sachs) beatmet. Durch die atemdepressive Wirkung der oben beschriebenen Injektionsnarkose war diese Form der kontrollierten Beatmung möglich. Frühere Studien aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass dieses unphysiologische I/E – Verhältnis (normal I/E 1:1,6 bis 1:1,8) zu keinen Schäden des Lungenparenchyms führt (Thal and Plesnila, 2007). Das Atemzugsvolumen (AZV) und die Atemfrequenz (AF) wurden den

jeweiligen Änderungen des endtidalen PCO_2 angepasst. Mit einem AZV von 200 – 250 μl und einer AF von 110 – 130/min konnte der endtidale PCO_2 bei 40 mmHg und der PO_2 zwischen 70 und 100 mmHg gehalten werden.

Mit der Mikrokapnometrie (CI240, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) konnten wir zeigen, dass die Messung des endtidalen PCO_2 eine exakte Methode darstellt, um auf den arteriellen PCO_2 zu schließen (Thal and Plesnila, 2007). Das Gerät wurde regelmäßig mit einem entsprechenden Eichgas geeicht. Um die Genauigkeit der Kapnometrie weiter zu gewährleisten, wurde bei jedem Tier der arterielle PCO_2 und PO_2 mit einem konventionellem Blutgasanalysegerät (Chiron 860, Bayer) gemessen. Das Blut wurde aus einem Katheter in der A. femoralis gewonnen.

2.3.3 Körpertemperatur

Aufgrund der fehlenden Muskelaktivität unter der durchgeführten Allgemeinanästhesie kühlen Mäuse extrem rasch aus (Thal and Plesnila, 2007). Die Körpertemperatur wurde daher mit einer rückkopplungsgesteuerten Heizmatte (FHC, Bowdoinham, USA) und einer rektalen Temperatursonde auf $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ gehalten. Im Anschluss an die Narkose wurden die Tiere bis zur vollständigen Erholung in einen 36°C warmen Inkubator (Intensiv-Pflegeinkubator 7510, Drägerwerk AG, Lübeck) gelegt, um der gestörten Temperaturautoregulation als Folge der Narkose gerecht zu werden (Thal and Plesnila, 2007).

2.4 Blutdruckmessung

Zur Messung des systemischen Blutdrucks in den IVM - Versuchen wurde auf eine invasive Methode zurückgegriffen. Hierfür wurde die linke A. femoralis im Verlauf dargestellt, inzidiert und ein selbsthergestellter, heparinierter Katheter mit einem Außendurchmesser von ca. 0,2 mm eingeführt. Der Katheter wurde anschließend mit bis zu drei Ligaturen (5/0, Pearsall Ltd., Taunton, UK) und Gewebekleber (Vetbond, 3TM Animal Care Products, St. Paul, MN, USA) befestigt. Der Zugang wurde dann über einen, mit 0,9% NaCl – Lösung, gefüllten Schlauch mit der piezoelektrischen Sensoreinheit (Gabarith PMSET 1DT-XX, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verbunden und an einen Verstärker (TAM A, Hugo Sachs, March-Hugstetten) angeschlossen.

Über ein computergestütztes System konnten die Daten angezeigt und aufgezeichnet werden (A/D converter PCI 9112, Adlink Technology, Taiwan; software: DasyLab 5.0, measX GmbH & Co.KG, Mönchengladbach).

2.5 Zerebrale Durchblutung

Änderungen der regionalen zerebralen Durchblutung (rCBF) wurden auf der ischämischen Hemisphäre während der Präparation zur Okklusion der A. cerebri media (MCAO) mit einer Laser-Doppler Fluxometrieinheit (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) gemessen (Heimann et al., 1994). Hierfür wurde der linke M. temporalis teilweise abgesetzt und eine Glasfasersonde (MT B500-0, Perimed, Stockholm, Schweden) mit einem Zwei-Komponentenkleber (Cyanoacrylate „Maxi-Cure“, Plastruct, City of Industry, CA, USA) an den Temporalknochen befestigt (Plesnila et al., 2003; Trabold et al., 2006). Somit konnte der rCBF in der von der MCA versorgten Region und damit die korrekte Lage des Okklusionsfadens angezeigt werden.

2.6 Okklusion der A. cerebri media

Als Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie verwendeten wir die intraluminale Fadenokklusion der A. cerebri media (Plesnila et al., 2001; Kataoka et al., 2004). Vorbereitend wurde ein monofiler 8/0 Faden (Ethilon, Ethicon GmbH, Norderstedt) in 11 mm lange Stücke geschnitten, diese anschließend zur Schonung der Blutgefäße und zur effektiveren Okklusion mit Silikon ummantelt (Xantopren® M und Activator universal, Heraeus Kulzer, Dormagen).

Die Versuchstiere wurden, wie unter 2.3 beschrieben, inhalativ mit einer Gesichtsmaske anästhesiert und nach Anbringen der Laser - Dopplersonde in Rückenlage auf der Heizmatte fixiert. Die Haut wurde zwischen Manubrium sterni und Mandibula median eröffnet, das Fettgewebe und die Glandulae submandibulares mobilisiert und mit einem Retraktor nach lateral verlagert. Die A. carotis communis (CCA) konnte nach Spaltung der Fasziae cervicalis superficialis et media in ihrem Verlauf unter Schonung der Nn. vagus et phrenicus und der infrahyalen Muskulatur entlang der Tachea dargestellt werden. Nach Präparation der Carotisbifurkation wurde die CCA möglichst stammnah und die A. carotis externa nahe der Bifurkation mit einem geflochtenen 5/0 Faden (Pearstalls Ltd., Taunton Somerset, UK) ligiert. Zur späteren Fixierung des Okklusionsfadens wurden die CCA im distalen Drittel nochmals mit einem 5/0 Faden angeschlungen. Vor der Inzision der Halsschlagader

wurde die A. carotis interna (ICA) proximal des Abganges der A. pterygopalatina mit einem Gefäßclip (Zen Temporary Clip No.10-b 13 x 0,4 mm, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan) verschlossen.

Nach Inzision der CCA wurde ein Okklusionsfaden in das Lumen bis zum Clip eingeführt, mit dem bereits liegenden Faden locker fixiert und die ICA wieder geöffnet. Im Anschluss konnte der Okklusionsfaden in den Abgang der MCA vorgeschoben werden. Die Okklusion galt als gesichert, wenn der rCBF über mindestens 60 s um mehr als 80% abfiel (Kataoka et al., 2004). Nach endgültiger Fixierung des Okklusionsfadens, konnte die Haut verschlossen werden und die Tiere wurden in den oben beschriebenen Inkubator bei 36°C gegeben.

Bei allen Tieren wurde nach einer Ischämiezeit von 45 min ($I=45\text{min}$) der Faden wieder entfernt, die CCA mit der ursprünglichen Anschlingung distal der Inzision verschlossen und die Haut erneut mit einer Einzelknopfnahnt versorgt. Nach weiteren 60 min wurden die Tiere wieder an den Tierstall übergeben.

Mäuse, die der Kontrollgruppe im Rahmen der IVM angehörten, wurden in analoger Art und Weise operiert, allerdings wurde der Okklusionsfaden nicht in die MCA vorgeschoben.

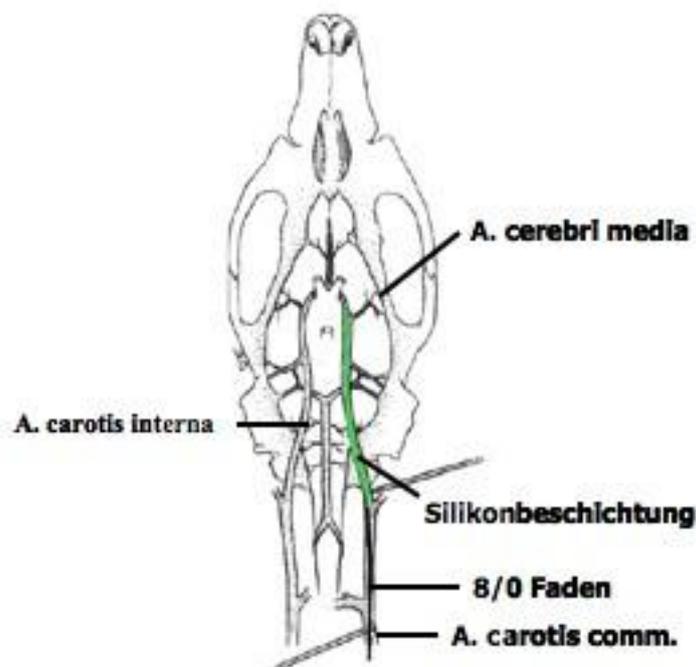


Abbildung 3: Hirnversorgende Arterien und Position des Okklusionsfadens

2.7 Intravitalmikroskopie

2.7.1 Prinzip der Epiillumination

Fluoreszenz beschreibt die Entstehung von Licht durch Bestrahlung eines Körpers mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ohne begleitende Temperaturerhöhung. Ausserdem leuchtet fluoreszierendes Licht nicht nach. Bei der Mikroskopie mittels Epiillumination wird ein zur Fluoreszenz fähiger Körper mit Licht der passenden Wellenlänge angeregt. Dieses wird durch eine externe Lichtquelle erzeugt und über einen Filter dem Körper zugeführt. Über Filter zur Sperrung des Anregungsspektrums kann dann die Fluoreszenzemission im Okular oder via Kamera beobachtet und aufgezeichnet werden.

2.7.2 Aufbau des Intravitalmikroskops

Mit Hilfe eines Epiilluminationmikroskops (Leitz, Wetzlar) konnten die oberflächlichen kortikalen Gefäße dargestellt und analysiert werden. Das Versuchstier wurde anästhesiert in einem stereotaktischen Versuchtisch fixiert und auf einem 2D-Mikrometertisch in den Strahlengang gebracht (Leitz, München). Durch diesen Tisch konnte die Hirnoberfläche in ein x-y-Koordinatensystem unterteilt werden und pro Versuch drei Venen und Arterien mit einem Durchmesser von 20 – 60 μm (Region of interest, ROI) wiederholt über die gesamte Versuchszeit aufgesucht werden. Der Mikrometertisch wurde über Computer gesteuerte Schrittmotoren in beiden Achsen gesteuert (Phytron, Gröbenzell). Als Anregungslichtquelle stand eine 75 W starke Xenongasentladungslampe (XBO 75 W/2, Leitz, München) zur Verfügung. Um Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlänge zu erhalten, wurde ein Filterblock in den Strahlengang zwischengeschaltet (Pleomopack, Leica, Wetzlar). Darunter versteht man eine Kombination von aufeinander abgestimmten Anregungs- und Sperrfiltern, die bequem und schnell ausgetauscht werden können.

Nach Injektion der mit Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFDA-SE, MW 557,5, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) *in vitro* markierten Thrombozyten (siehe 2.8.3.) konnte mit Hilfe eines Salzwasserimmersionsobjektivs (W25 x /0,6, Leitz, Wetzlar) das Anregungslicht im Objekt konzentriert und gleichzeitig das emittierte Fluoreszenzlicht wieder gesammelt werden. Die sichtbaren Bildelemente wurden dann über eine hochauflösende Silikon-intensivierte Restlichtkamera (C2400-08, Hamatsu Photonics, Herrsching) auf einer PAL-TV Einheit (Sony, Japan) dargestellt

und auf S-VHS aufgezeichnet (MQSE – 120, Sony, Japan). Mit einem zusätzlichen Videotimer (VTG – 33, FOR A Company Ltd., Japan) konnten Datum und Uhrzeit eingespielt werden. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die Analyse der Aufnahmen erfolgte in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines computergestütztem Mikrozirkulations-Analysesystems (Capimage, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) bei einer kumulativen Vergrößerung von 625.

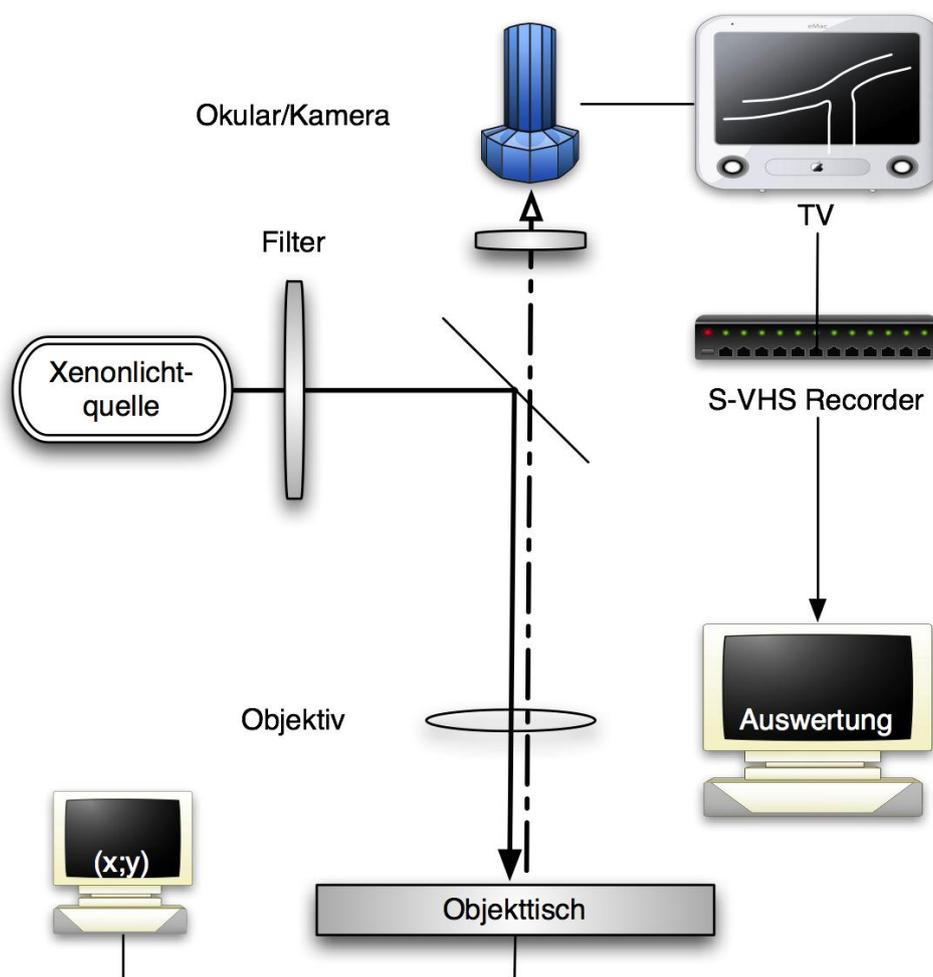


Abbildung 4: Schematische Darstellung des IVM Versuchsaufbaus

2.7.3 Präparation zur Intravitalmikroskopie

Für die IVM mussten die Versuchstiere nach entsprechender Reperfusionzeit narkotisiert, intubiert und beatmet werden. Zur Messung des Blutdrucks, zur Entnahme von arteriellen Blutproben und zur Applikation der *in vitro* angefärbten Thrombozyten sowie der 0,9%igen NaCl Lösung (0,04 ml/h) erhielten die Mäuse selbst hergestellte Katheter in die linksseitigen Femoralgefäße. Danach wurden die Tiere in Bauchlage über eine Nasenklemme an einen stereotaktischen Versuchstisch fixiert und die Kopfhaut in sagittaler Schnittführung eröffnet.

Nach Abspannen der Haut zu einem Trichter konnte der Schädel ca. 2x2 mm über der infarzierten Hemisphäre bzw. Penumbra eröffnet werden. Um in der IVM später einen möglichst hohen Bildkontrast zu erreichen und um keine zusätzliche Schädigung der infarzierten Hemisphäre auszulösen, war es nötig die Dura mater unter allen Umständen intakt zu lassen. Die dargestellte harte Hirnhaut wurde kontinuierlich mit körperwarmer 0,9%iger NaCl Lösung benetzt.

Etwa 20 Minuten vor der ersten Aufnahme wurden die *in vitro* markierten Thrombozyten unter Lichtschutz über 10 Minuten i.v. verabreicht und im Anschluss die entsprechenden Gefäße aufgesucht.

2.7.4 Thrombozyten-Endothelinteraktion

Nach der Aufzeichnung von drei bis vier ROI über je 45 s pro Messzeitpunkt konnten folgende Parameter bestimmt werden:

- **rollende Thrombozyten (*roller*):** Anzahl der am Endothel rollenden Thrombozyten

Zur Auswertung wurde in jedem Gefäß eine 100 µm lange Strecke abgemessen. *Roller* wurden definiert als alle Zellen, die diese Strecke mit einer signifikant langsameren Geschwindigkeit als die Übrigen der markierten Thrombozyten passierten.

- **adhärente Thrombozyten (*sticker*):** Anzahl der am Endothel adhärenen Thrombozyten

Als *sticker* wurden alle Thrombozyten bezeichnet die $t > 30$ s ohne Positionsänderung an der Gefäßinnenwand anhafteten (Massberg et al., 1998).

Mit Hilfe einer computergestützten Mikrozirkulationsanalyseeinheit (Capimage, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) konnten alle ROI jeweils dreimal ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt und als Anzahl [n] Thrombozyten pro Gefäßabschnitt und Zeiteinheit angegeben [$n/100 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$].

2.8 Blutungszeit

Den inhalativ narkotisierten Tieren wurde zur Bestimmung der Blutungszeit vor und eine Stunde nach Applikation des unten stehenden GPIIb/IIIa Antikörpers je 3 mm der Schwanzspitze amputiert. Durch Auftupfen eines Filterpapiers auf die Wunde konnte die Blutungsaktivität alle 15 s beobachtet und quantifiziert werden. Endpunkt war hier der Zeitpunkt, an dem kein Blut auf dem Papier mehr nachweisbar war. Falls notwendig wurde die Blutung nach 10 min mit Fibrinkleber gestoppt (Massberg et al., 2003).

2.9 Thrombozytenzählung

Zur Quantifizierung der transfundierten und angefärbten Thrombozyten und als Maß der Depletion durch den GPIIb/IIIa-Ak wurde ein Impedanz - Zellzählssystem (Coulter ACT 8 Counter, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) verwendet. Hierbei werden gleichzeitig ein definierter Strom und die zu messende Zellsuspension, z.B. Vollblut, durch Kapillaröffnungen geschickt. Passieren die Zellen die Messöffnungen so ändert sich proportional zu ihrer Größe auch die Impedanz (Wechselstromwiderstand), wodurch das System Aufschluss über die Zellgrößenverteilung geben kann (Grover et al., 1972).

2.10 Thrombozytendepletion: GPIIb/IIIa-Antikörper

Zur Depletion der Thrombozyten verwendeten wir gereinigtes, gegen murines GPIIb/IIIa (CD42b) gerichtetes, Ratten-IgG (R300, Emfret Analytics, Würzburg). Mit einer Dosis von 2 $\mu\text{g/g}$ KG, gelöst in 200 μl PBS-Puffer, konnte 60 Minuten nach Applikation die Anzahl der im Vollblut nachweisbaren Thrombozyten um >95% verringert werden (Kleinschnitz et al., 2007). Durch die Depletion der zirkulierenden Thrombozyten konnte davon ausgegangen werden, dass im Rahmen dessen ebenfalls die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothel abnehmen. Daneben interagiert der GPIIb-V-IX-Komplex mit dem endothelständigen von Willebrand Faktor (Kuijpers et al., 2004). Die Zunahme der Blutungszeit konnte daher als zusätzliches Maß einer ausreichenden Depletion angesehen werden (Andrews et al., 2003; Kleinschnitz et

al., 2007). Zur Kontrolle wurde ein Antikörper ohne thrombozytotoxische Wirkung in gleicher Dosis verabreicht (C301, Emfret Analytics, Würzburg).

2.11 Neurologischer Befund

Die neurologischen Funktionen nach fokaler zerebraler Ischämie wurden mit dem modifizierten „neurological severity score“ (NSS) (Shapira et al., 1988) erfasst. Die entsprechenden Testparameter können objektiv, eine ruhige Umgebung vorausgesetzt, recht leicht bestimmt werden. Der NSS erfasst neben der motorischen Funktion auch physiologisches Suchverhalten, Koordination und Weckreaktion. Die Tiere wurden zur Gewöhnung an den Test und die Umgebung zweimal pro Tag an zwei aufeinander folgenden Tagen vor Versuchsbeginn trainiert. Nach MCAO und Reperfusion wurde die neurologische Evaluation nochmals wiederholt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über den NSS.

Aufgabe	Beschreibung	Punkte	
Verlassen eines Kreises	Fähigkeit einen Kreis mit Durchmesser 1 m zu verlassen	In unter 2 Minuten	0
		Verbleibt auf der Begrenzung	0,5
		Verbleibt innerhalb der Begrenzung	1
		Verbleibt im Kreis, ohne Bewegung	2
Suchverhalten	Als Parameter von physiologischem Verhalten	Aktives Suchen	0
		Langsames Suchen	1
		Keine Bewegung	2
Startreaktion	Weckreaktion auf plötzlichen akustischen Reiz (Klatschen)	Spontane Bewegung	0
		Bewegung nach Klatschen	1
		Keine Bewegung nach Klatschen	2
Geradeaus gehen	Fähigkeit geradeaus zu gehen, nachdem die Maus auf den Boden gesetzt wurde	Geradeaus	0
		Im Kreis	1
		Keine Bewegung	2
Hemiparese	Bewegung der vorderen u/o hinteren Extremität	Keine Hemiparese	0
		Hinken	1
Balken: 3 cm	Fähigkeit 80 cm auf einem 3 cm breiten Balken zu gehen	Kein Fehltritt	0
		Wiederholte Fehltritte	1
		Tier fällt runter	2
Balken: 2 cm	Fähigkeit 80 cm auf einem 2 cm breiten Balken zu gehen	Kein Fehltritt	0
		Wiederholte Fehltritte	1
		Tier fällt runter	2
Balken: 1 cm	Fähigkeit 80 cm auf einem 1 cm breiten Balken zu gehen	Kein Fehltritt	0
		Wiederholte Fehltritte	1
		Tier fällt runter	2
Balancieren auf eckigem Stab	Fähigkeit auf einem eckigen Stab zu verbleiben mit einer Kantenlänge von 7 mm	Festhalten mit 4 Beinen	0
		Festhalten mit 3 Beinen	0,5
		Fällt nach Bewegung des Stabes	1
		Fällt sofort nach Aufsetzen auf Stab	2
Balancieren auf rundem Stab	Fähigkeit auf einem runden Stab zu balancieren mit einem Durchmesser von 5 mm	Festhalten mit 4 Beinen	0
		Festhalten mit 3 Beinen	0,5
		Fällt nach Bewegung des Stabes runter	1
		Fällt sofort nach Aufsetzen auf Stab	2

Tabelle 2: Parameter und deren Gewichtung im NSS

2.12 Histologie

2.12.1 Gefrierschnitte

Im Rahmen der MCAO-Standardisierung wurden die Tiere 24 h nach erfolgter MCAO in tiefer Inhalationsnarkose durch zervikale Translokation gekeult. Der Schädel wurde eröffnet, das Gehirn in Trockeneisgranulat schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert. Zur Herstellung von Gefrierschnitten von 10 µm Dicke wurden die Präparate eingebettet (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) und in einem Kryostaten (CryoStar HM 560, Microm, Walldorf) geschnitten. Der Startpunkt lag 1000 µm distal des Bulbus olfactorius, alle 750 µm wurden dann 4 Schnitte angefertigt. Nach erfolgter HE Färbung, Fixierung und Versiegelung wurden die Schnitte mit einer an einem Mikroskop (Olympus BX50, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) angebrachten Digitalkamera (Olympus Camedia C5050, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) fotografiert. Die Fläche der ischämischen Läsion pro Schnitt konnte mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Olympus DP-soft, analySIS, Version 3.2) bestimmt und das Volumen näherungsweise entsprechend $V = 0,75 \times (A_1 + A_2 + \dots + A_n)$ mit $n =$ Anzahl der Schnitte berechnet werden.

2.12.2 Paraffinschnitte

Zur Quantifizierung der geschädigten Neurone waren Schnitte mit einer Dicke von 5 µm notwendig. Da diese nicht in entsprechender Qualität mittels Kryostat angefertigt werden konnten, mussten die entsprechenden Gehirne in Paraffin eingebettet werden. Nach intraperitonealer Verabreichung von 200 µl Chloralhydrat, wurde der Thorax median eröffnet und das Versuchstier mit Phosphat-gepufferter 4%-Paraformaldehydlösung (PFA) perfusionsfixiert. Hierfür wurde der linke Herzventrikel mit einer Einmalkanüle punktiert, das rechte Herzohr inzidiert und das Gefäßbett mit 0,9%iger NaCl Lösung bei einem Druck von 100 cmH₂O perfundiert. Anschließend erfolgte die Infusion der PFA – Lösung über weitere 10 Minuten. Das Gehirn konnte dann für 24 h in PFA und anschließend für längere Zeit in 96% Ethanol gelagert werden.

Nach entsprechender Entwässerung wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und mit einem Rotationsmikrotom in 5 µm dicke Koronarschnitte in einem Abstand

von 500 µm geschnitten, auf Objektträger gegeben und nach Nissl mit Kresylviolett gefärbt.

Die Auswertung des Infarktvolumens erfolgte in analoger Weise zu obigem Verfahren. Zur Quantifizierung des neuronalen Zelltodes wurden sowohl vitale, als auch geschädigte Neurone im Bereich des ipsi- und kontralateralen Hippokampus mit der gleichen Software ausgezählt. Jeder Schnitt wurde insgesamt dreimal ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt.

2.13 Versuchsgruppen und Protokolle

2.13.1 MCAO Standardisierung

Zur Standardisierung des experimentellen transienten zerebralen Ischämie Modells wurden n=9 Tiere einer MCAO unterzogen, ihre Hirne nach einer Reperfusionzeit von 24 h entnommen und mittels Kryostat nach dem oben beschriebenen Verfahren geschnitten (Abb. 5). Das Modell galt als reproduzierbar, wenn der Variationskoeffizient (=Standardabweichung/Mittelwert) der Infarktvolumina kleiner 20% betrug.



Abbildung 5: MCAO Standardisierung; MCAO: Okklusion der A. cerebri media (n=9)

2.13.2 Thrombozytenisolierung und -anfärbung

Für die Untersuchung der PEI wurden Thrombozyten eines artgleichen Spendertiers nach unten stehendem Protokoll isoliert und *in vitro* mit Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFDA-SE, MW 557,5, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) angefärbt. CFDA-SE diffundiert durch die Zellmembran der Thrombozyten und wird über intrazelluläre Esterasen gespalten. Das Abbauprodukt produziert eine messbare Fluoreszenz und bindet kovalent an intrazelluläres Lysin, wodurch eine lange und gleichmäßige Färbung der Zellen erzielt werden kann. Reinheit und Funktionalität der markierten Thrombozyten wurden durch durchflusszytometrische Untersuchungen (FACSsort, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) validiert (Massberg et al., 1998; Massberg et al., 2003). Das Färbeprotokoll bestand aus folgenden Schritten:

- Narkotisierung des Versuchstieres, mediane Laparo- und Thorakotomie
- Punktion des linken Ventrikels mit einer 24 G Punktionsnadel und einer 2 ml Spritze, gefüllt mit 200 μ l Alsever`s Puffer (selbsthergestellt, in 1000ml Aqua dest.: 8,0 g Tri-Na Vitrat x 2 H₂O, 4,2 g NaCl, 20,5 g Glucose x 1 H₂O, 0,55 g Ascorbinsäure, mit NaOH auf pH 6,2) und 15 μ l Prostaglandin E1 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München); Punktionsvolumen mindestens 0,7 – 0,8 ml Vollblut
- Verdünnen in 500 μ l Dulbecco`s Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (D-PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺), zentrifugieren bei 100 g für 10 min und 24°C
- Überstand in 1500 μ l D-PBS, 450 μ l Alsever`s Puffer, 50 μ l Prostaglandin E1 und 2 μ l CFDA-SE für 15 min unter Lichtschutz bei 37°C inkubieren
- Zentrifugieren bei 1430 g für 10 min bei 24°C
- Resuspendieren des Pellets mit 200 μ l D-PBS-Puffer und Bestimmung der Thrombozytenkonzentration mit dem Coulter ACT Counter
- Injektion der gelösten Thrombozyten in einer Konzentration von ca 100 x 10³/ μ l

2.13.3 Intravitalmikroskopie

Zur Messung der PEI wurden Versuchstiere sechs Gruppen von je n=7 Tieren den MCAO- bzw. der Kontrollgruppe (Ischämie 45 min) zugeführt. Nach Reperusionszeiten von 1 h, 3 h, 5 h, 12 h und 24 h erfolgte die erste Aufnahme der kortikalen Gefäße. Dies wurde in den folgenden 150 min alle 30 min wiederholt. Zur späteren histologischen Untersuchung wurden die Gehirne mit PFA perfundiert, gelagert und später in Paraffin fixiert (Abb. 6).

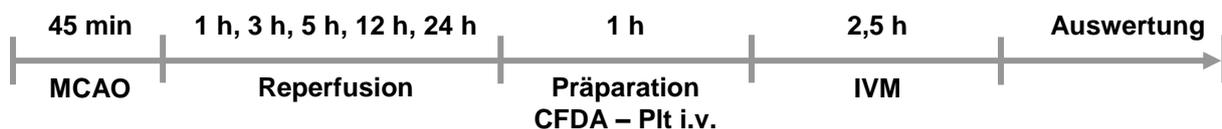


Abbildung 6: Versuchsablauf IVM; IVM: Intravitalmikroskopie, MCAO: Okklusion der A. cerebri media, CFDA-Plt: mit Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester gefärbte Thrombozyten (Plt) (n=7)

In einer weiteren Serie wollten wir die IVM-Versuche in analoger Weise unter Thrombozytendepletion wiederholen. Durch heftige Blutungskomplikationen durch

die Operation bzw. die Beatmung bei n=7 Tieren und einer Mortalität von 100% in diesen Vorversuchen konnte dies jedoch nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden unten beschriebene Versuche vorgenommen.

2.13.4 GPIIb/IIIa-Antikörper Physiologie

Bevor die Auswirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibition auf das Infarktverhalten beobachtet werden konnte, musste die Wirkung des Antikörpers auf die Thrombozytenzahl und die Blutungszeit 1 h (n=3) und 24 h (n=3) nach Applikation überprüft werden. Außerdem sollten die unterschiedlichen Applikationsarten i.v. in die Schwanzvene und i.p. miteinander verglichen werden. Im Anschluss an die Blutentnahme wurde die Milz als Hauptabbauorgan der Thrombozyten reseziert und gewogen. Hierfür wurden folgende Gruppen und Versuchsabläufe aufgestellt:

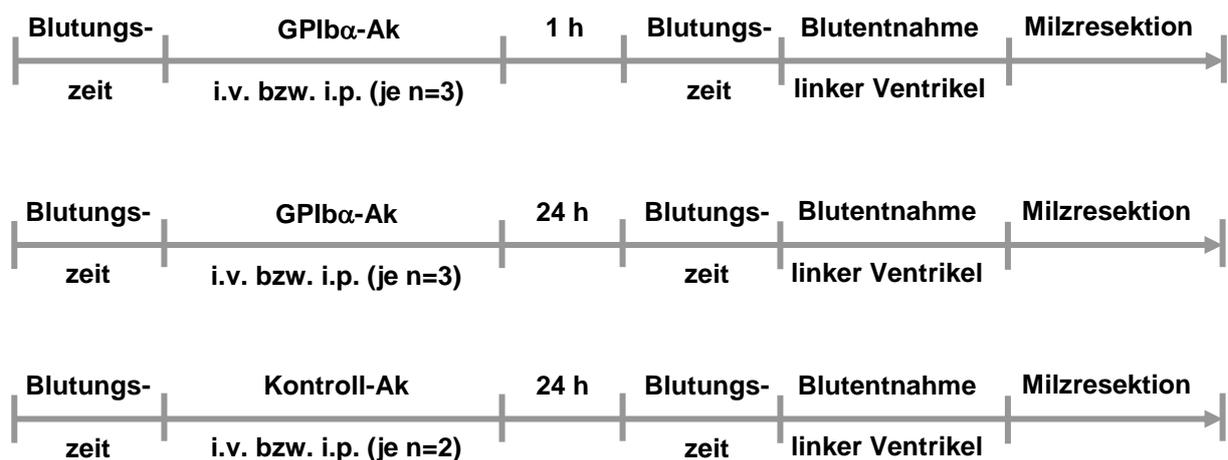


Abbildung 7: Bestimmung von Blutungszeit und Thrombozytenanzahl 1 h und 24 h nach GPIIb/IIIa-Ak (R300) und Kontroll-Ak (C301), Applikation i.v. und i.p. (n=3 bzw. n=2)

2.13.5 MCAO und GPIIb/IIIa-Inhibition

Um die Auswirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibition auf den neurologischen Befund, das Infarktverhalten und den neuronalen Zelltod zu untersuchen, wurden die Thrombozyten von n=6 Versuchstieren zu verschiedenen Zeiten nach erfolgter MCAO durch i.p.-Gabe des GPIIb/IIIa-Ak depletiert. Da bereits nach 1 h eine Depletion von >95% bestand, wurde der Antikörper 1 h vor und direkt bei Einsetzen der Reperfusion (R) appliziert, ebenso wie 2 h, 4 h und 6 h nach Entfernung des Okklusionsfadens. Die einzelnen Gruppen wurden entsprechend ihres Depletionszeitpunktes eingeteilt (R+0h, +1h, +3h, +5h, +7h und n.t. (not treated) als Kontrolle (MCAO ohne GPIIb/IIIa-Ak-Gabe)). Wie oben beschrieben betrug die

Ischämiezeit in allen Gruppen wieder 45 min. Die Entscheidung genau zu diesen Zeitpunkten Depletion und MCAO durchzuführen, fiel aufgrund der Beobachtungen der PEI in der IVM. Alle Tiere wurden über zwei Tage an die Umgebung und die Durchführung des NSS gewöhnt. Der abschließende NSS, sowie die Hirnentnahme erfolgte nach R = 24 h.

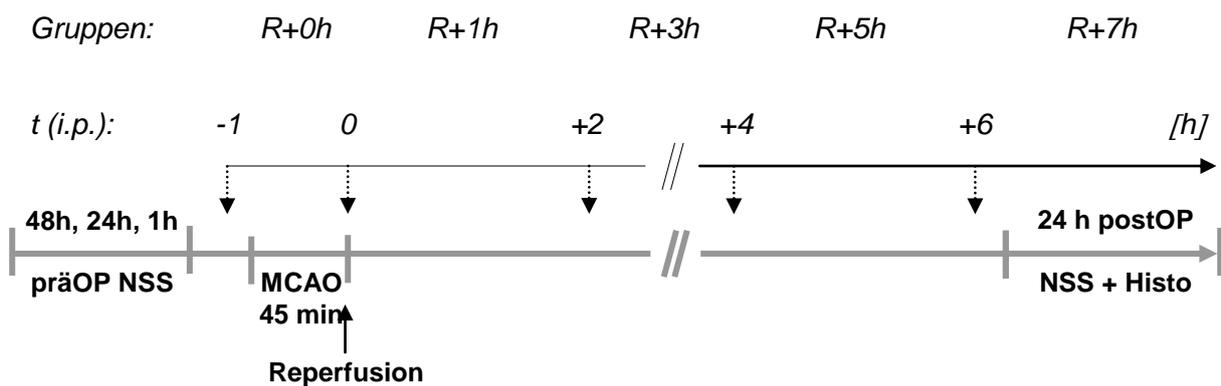


Abbildung 8: Versuchsschema zur GPIIb/IIIa-Inhibition mit Gruppenbezeichnung und den entsprechenden Injektionszeitpunkten; Bestimmung von NSS und Läsionsvolumen; MCAO: Okklusion der A. cerebri media; NSS: neurological severity score (n=6)

2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde computergestützt durchgeführt (Sigma Stat 3.0, Jandel Scientific, Erkrath). Um Merkmale zwischen mehreren Gruppen zu vergleichen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA one way) verwendet. Zur Analyse eines Merkmals über die Zeit innerhalb einer Gruppe (z.B. NSS) wurde dieses gegen den Nullwert mit dem Friedman Test für wiederholte Messungen (ANOVA on ranks) getestet. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für alle Methoden galt der Dunn's Test als post hoc Verfahren. Alle Ergebnisse sind – soweit nicht anders vermerkt – als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM) angegeben. Ein p-Wert von unter $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 MCAO-Standardisierung

3.1.1 Zerebrale Durchblutung

Zur Überwachung und Dokumentation der MCAO während der Standardisierungsversuche wurde der regionale Blutfluss (rCBF) vor und 45 min nach Okklusion mittels Laser-Doppler-Fluorimetrie überwacht (Plesnila et al., 2003; Kataoka et al., 2004; Kataoka et al., 2005). Der rCBF der Versuchstiere (n=9) ging direkt nach korrekter Lage des Fadens auf $9,2 \pm 0,9\%$ baseline zurück und blieb auch nach 45 min bei $12,3 \pm 1,3\%$ baseline. Es konnte somit ein signifikanter Rückgang der regionalen Durchblutung auf ischämische Werte im Versorgungsgebiet der linken MCA nach Okklusion beobachtet werden. So lange der Okklusionsfaden im Gefäß verblieb änderte sich der rCBF nicht signifikant.

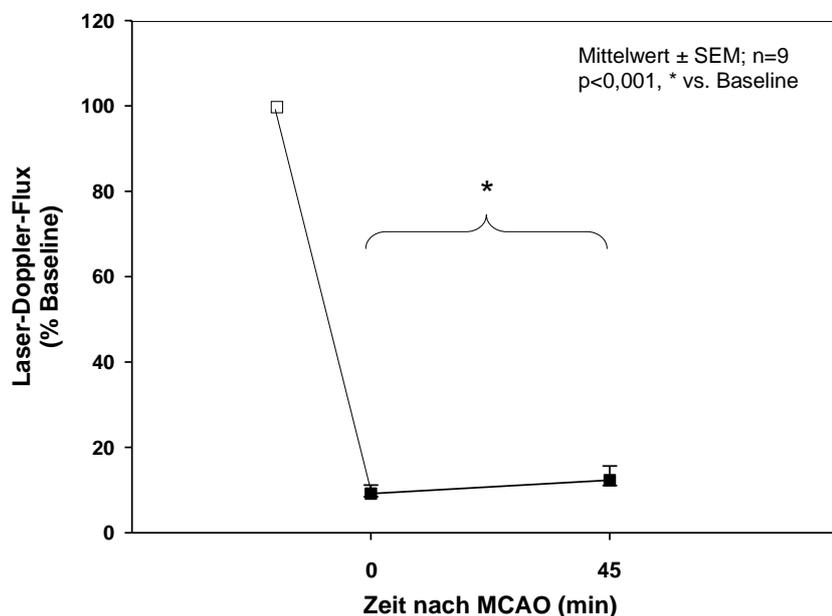


Abbildung 9: rCBF in Prozent der Baseline vor und nach MCAO (n=9); SEM: Standardabweichung vom Mittelwert, MCAO: Okklusion der A. cerebri media, rCBF: regionaler zerebraler Blutfluss (n=9)

3.1.2 Infarktvolumen

Das Infarktvolumen wurde 24 h nach MCAO an Gefrierschnitten bestimmt (Abb. 10). Bei n=9 Tieren betrug das Infarktvolumen un behandelter Tiere $65,6 \pm 4,0 \text{ mm}^3$ bei einem Variationskoeffizienten von 18%. Das Volumen der traumatisierten Hemisphäre betrug $169,3 \pm 4,5 \text{ mm}^3$, das der kontralateralen $144,0 \pm 2,4 \text{ mm}^3$. Die Schwellung der ischämischen Hemisphäre betrug demnach 17,6%. Intrazerebrale Blutungen (ICH) wurden nicht beobachtet (Abb. 10).

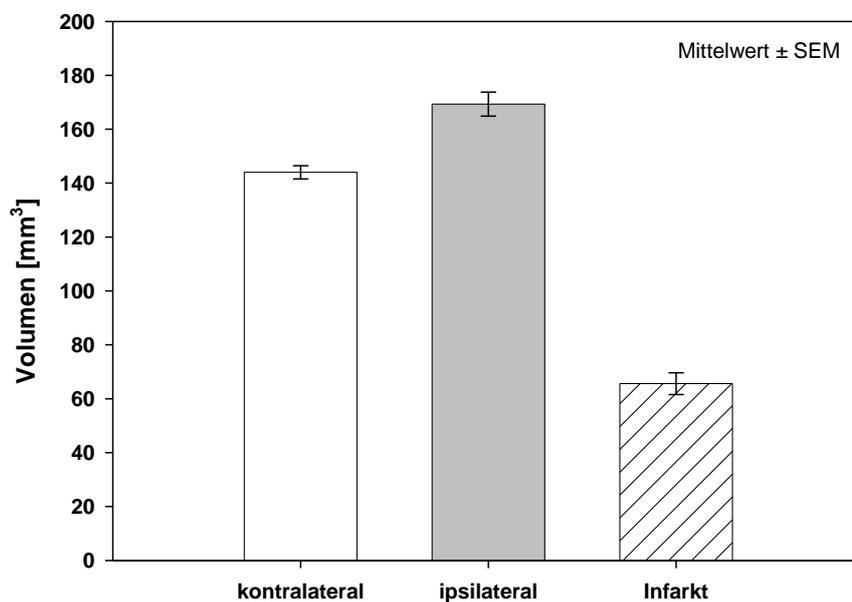


Abbildung 10: Volumina der kontra-/ipsilateralen Hemisphäre und des infarzierten Areales (n = 9); SEM: Standardabweichung vom Mittelwert

3.2 Thrombozyten Endothelinteraktion

3.2.1 Vitalparameter

Während der IVM-Versuche zur Messung der PEI konnten durch die verwendeten Narkoseverfahren bei allen Tieren ungeachtet der Versuchsgruppe die Vitalparameter wie mittlerer arterieller Druck (MAP), arterieller pH, PaO₂ und PaCO₂ innerhalb physiologischer Grenzen gehalten werden (Tab. 3) (Thal and Plesnila, 2007). Die Körpertemperatur betrug konstant 37,0 ± 0,1°C (Daten nicht gezeigt).

		Zeit [min]				
		0	30	60	90	120
MAP [mmHg]	I/R 1h	100,86 ± 5,44	96,52 ± 7,57	92,83 ± 5,26	80,50 ± 6,32	80,25 ± 6,70
	I/R 3h	83,86 ± 8,57	80,00 ± 9,00	68,43 ± 8,20	64,17 ± 8,16	66,00 ± 13,18
	I/R 5h	97,09 ± 7,94	95,17 ± 8,33	85,50 ± 7,59	77,00 ± 7,56	60,67 ± 12,20
	I/R 12h	70,50 ± 1,71	70,25 ± 1,89	67,75 ± 7,02	65,75 ± 4,88	66,50 ± 10,83
	I/R 24h	88,20 ± 12,10	81,75 ± 7,50	81,15 ± 8,63	82,78 ± 12,13	71,20 ± 6,59
	Kontrolle	90,05 ± 9,03	93,00 ± 7,08	81,00 ± 4,65	71,67 ± 6,53	63,67 ± 2,89
pH	I/R 1h					7,22 ± 0,22
	I/R 3h					7,25 ± 0,02
	I/R 5h					7,23 ± 0,02
	I/R 12h					7,11 ± 0,02
	I/R 24h					7,17 ± 0,03
	Kontrolle					7,22 ± 0,02
PaO₂ [mmHg]	I/R 1h					105,55 ± 10,40
	I/R 3h					126,73 ± 14,99
	I/R 5h					116,23 ± 16,19
	I/R 12h					111,45 ± 8,98
	I/R 24h					149,30 ± 12,95
	Kontrolle					105,93 ± 9,61
PaCO₂ [mmHg]	I/R 1h					42,23 ± 4,85
	I/R 3h					43,21 ± 1,44
	I/R 5h					33,53 ± 1,56
	I/R 12h					44,23 ± 1,71
	I/R 24h					36,20 ± 1,87
	Kontrolle					41,48 ± 2,14

Tabelle 3: Vitalparameter zu den angegebenen Zeitpunkten während der IVM; innerhalb und zwischen den einzelnen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied im mittleren arteriellen Druck beobachtet werden ($p > 0,05$); MAP, mittlerer arterieller Druck, IVM: Intravitalmikroskopie

3.2.2 Venöses Gefäßbett

Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es nach einer Reperfusionzeit von 1 h, 3 h und 5 h zu einer Zunahme rollender Thrombozyten von bis zu 294% (1 h: $6,0 \pm 0,3$ Plt; 3 h: $11,3 \pm 0,5$ Plt; 5 h: $13,0 \pm 0,7$ Plt vs. Kontrolle: $3,3 \pm 0,3$ Plt, $p < 0,05$). Nach 12 h und 24 h Reperfusion konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb.11) (12 h: $3,9 \pm 0,3$ Plt; 24 h: $4,1 \pm 0,3$ Plt, $p > 0,05$).

Eine signifikante Zunahme der adhärenenten Thrombozyten beobachteten wir in den postkapillären Venolen nur 3 h bzw. 5 h nach Wiedereinsetzen der Durchblutung (3 h: $0,8 \pm 0,1$ Plt; 5 h: $1,3 \pm 0,2$ Plt vs. Kontrolle: $0,1 \pm 0,8$ Plt, $p < 0,05$). In den Gruppen 1 h, 12 h und 24 h blieb die Anzahl adhärenenten Thrombozyten auf dem Niveau der Kontrollgruppe (Abb. 12).

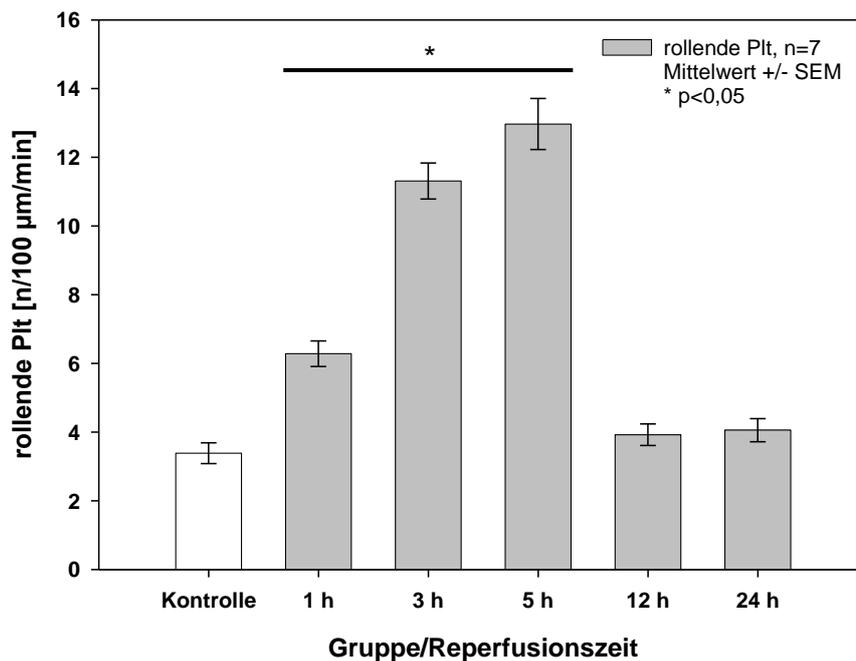


Abbildung 11: Rollende Thrombozyten (Plt) im postkapillären Gefäßbett nach 45 min MCAO; Kontrolle (keine MCAO bei sonst gleicher Präparation); MCAO: Okklusion der A. cerebri media, SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=7)

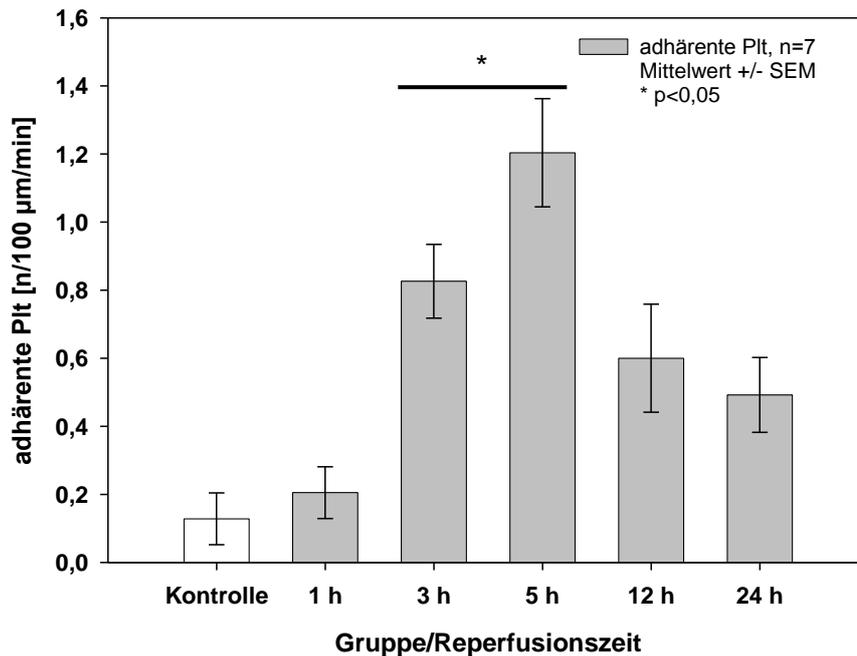


Abbildung 12: Adhärenente Thrombozyten (Plt) im postkapillären Gefäßbett nach 45 min MCAO; Kontrolle (keine MCAO bei sonst gleicher Präparation); MCAO: Okklusion der A. cerebri media, SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=7)

3.2.3 Arteriellles Gefäßbett

Im präkapillären Gefäßbett zeigte sich eine ähnliche Verteilung von rollenden und adhärenenten Thrombozyten in den verschiedenen Gruppen, allerdings um den Faktor 10 weniger als im Vergleich zum postkapillären Gefäßbett.

Nur 3 h nach der Ischämie konnte eine signifikante Zunahme der rollenden Thrombozyten beobachtet werden (3 h: $1,4 \pm 0,2$ Plt vs. Kontrolle: $0,2 \pm 0,1$ Plt, $p < 0,05$). Adhärenente Thrombozyten zeigten im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied in den beobachteten arteriellen Gefäßen (Abb. 14).

Abbildung 15 zeigt Ausschnitte aus den Videosequenzen, wie sie zur Auswertung der IVM-Versuche verwendet wurden.

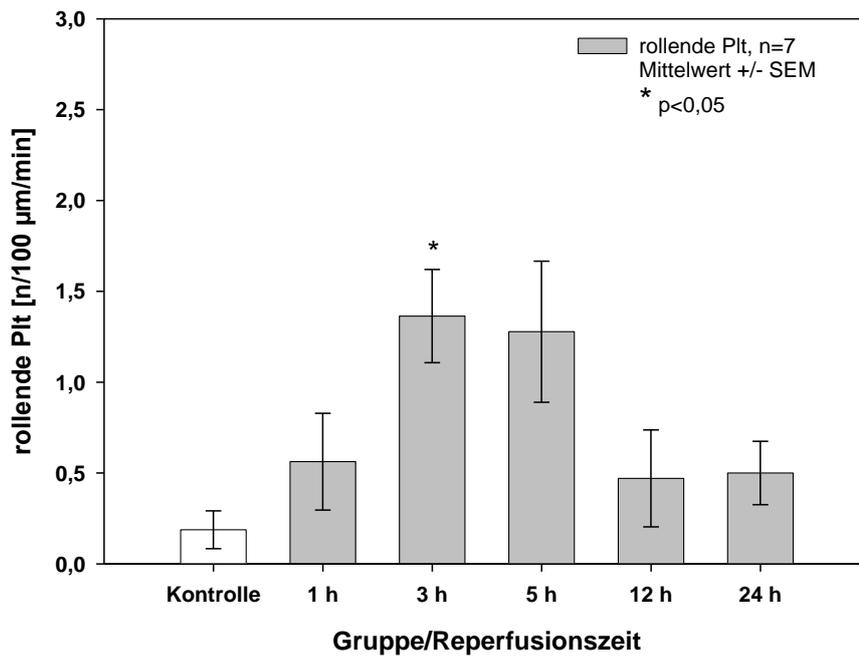


Abbildung 13: Rollende Thrombozyten (Plt) im präkapillären Gefäßbett nach 45 min MCAO; Kontrolle (keine MCAO bei sonst gleicher Präparation); MCAO: Okklusion der A. cerebri media, SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=7)

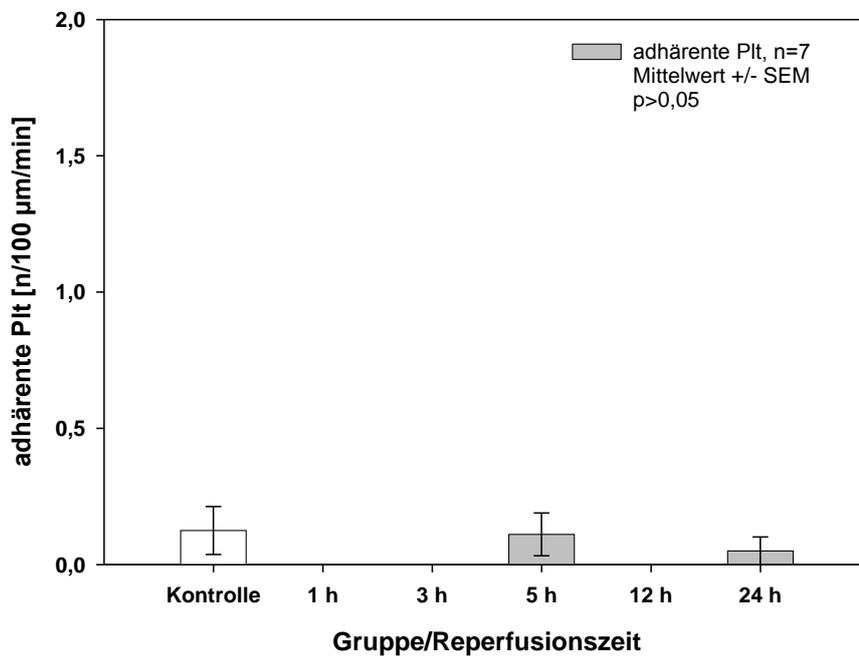


Abbildung 14: Adhärenente Thrombozyten (Plt) im präkapillären Gefäßbett nach 45 min MCAO; Kontrolle (keine MCAO bei sonst gleicher Präparation); MCAO: Okklusion der A. cerebri media, SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=7)

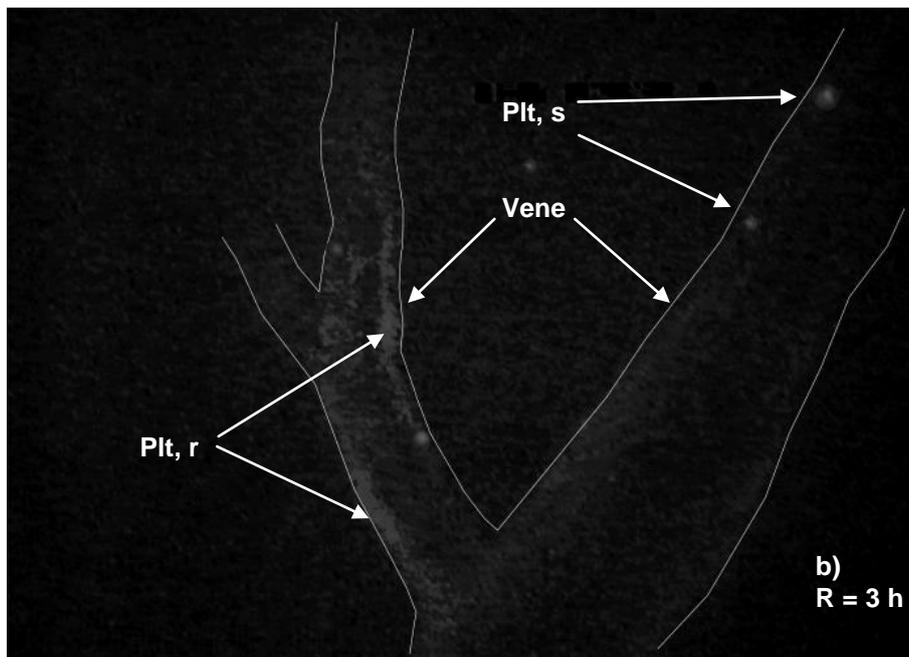
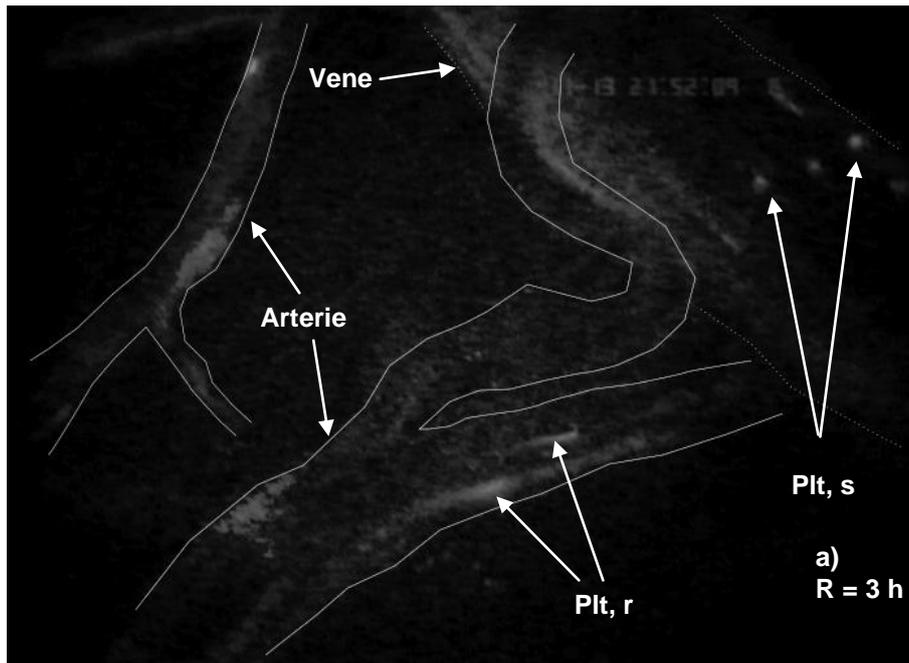


Abbildung 15: Einzelne Bilder der Videomitschnitte aus der Gruppe R=3 h der IVM-Versuche mit einer Belichtungszeit von 2,5 sec um einen besseren Eindruck der rollenden Thrombozyten als „Streifen“ zu bekommen; **a)** zeigt neben den beiden Arterien noch ein Vene mit $t > 30$ s adhärenenten Thrombozyten; **b)** eine typische venöse Gefäßbifurkation; Plt, s: adhärenente Thrombozyten, Plt, r: rollende Thrombozyten

3.2.4 Depletion und Thrombozyten-Endothel-Interaktionen

Wie im Abschnitt 2.13.3 beschrieben, konnten die IVM-Versuche nicht unter Thrombozytendepletion durchgeführt werden, da in den Vorversuchen alle Tiere auf Grund von Blutungskomplikationen verstarben ($n=7$) und somit chirurgische Maßnahmen, wie sie zur IVM nötig gewesen wären, nicht durchführbar waren.

3.3 MCAO unter Depletion

3.3.1 Thrombozytendepletion und Blutungszeit

C57/Bl6 Mäuse besitzen physiologischerweise durchschnittlich $231 \pm 16 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten (gemessen mit oben beschriebenem Zellzähler) bei einer Blutungszeit von $334 \pm 8 \text{ s}$ (Referenz, $n=39$). Bei i.v. Gabe des GPIIb/IIIa-Ak sanken die Thrombozyten nach 1 h und 24 h um 96 bzw. 97% ab (1 h i.v.: $9 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{l}$ Plt; 24 h i.v.: $6 \pm 4 \times 10^3/\mu\text{l}$ Plt). Nach i.p. Applikation konnte ein Rückgang der Thrombozyten um 95% (1 h i.p.: $13 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{l}$ Plt; 24 h i.p.: $11 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{l}$ Plt) beobachtet werden. In beiden Gruppen stieg die Blutungszeit bei allen Tieren bereits nach 1 h auf Werte über 10 min an und blieb auch nach 24 h auf dem gleichen Niveau (Abb. 16 und 17). Alle Tiere, die mit dem GPIIb/IIIa-Ak behandelt wurden, zeigten eine nicht signifikante Gewichtszunahme der Milz (GPIIb/IIIa-Ak i.p. 1 h: $58,8 \pm 1,7 \text{ mg}$, GPIIb/IIIa-Ak i.p. 24 h: $71,9 \pm 5,8 \text{ mg}$, $p>0,05$; GPIIb/IIIa-Ak i.v. 1 h: $62,1 \pm 1,2 \text{ mg}$, GPIIb/IIIa-Ak i.v. 24 h: $74,5 \pm 4,9 \text{ mg}$, $p>0,05$). Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Applikationsarten bezüglich Thrombozytendepletion und Blutungszeit beobachtet werden. Für die weiteren Versuche wurde daher auf die technisch weniger aufwendige und zuverlässigere i.p. Gabe zurückgegriffen. Der nicht-immunogene Antikörper C 301 zeigte keine signifikanten Unterschiede zu oben aufgeführten physiologischen Referenzwerten.

3.3.2 Neurologische Folgen

Die Versuchstiere zeigten nach zwei Tagen Training einen NSS von $1,9 \pm 0,2$ Punkten. In der Kontrollgruppe ohne GPIIb/IIIa-Ak wiesen die Tiere 24 h nach zerebraler Ischämie Werte von $13,9 \pm 0,9$ Punkten auf. In den Behandlungsgruppen hingegen konnte zu allen Zeitpunkten eine signifikante Verbesserung ($p<0,05$) des neurologischen Befundes gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden, wobei insbesondere die Gruppen R+5h und R+7h mit $6,3 \pm 1,0$ bzw. $3,3 \pm 0,3$ Punkten am besten abschnitten (Abb. 18).

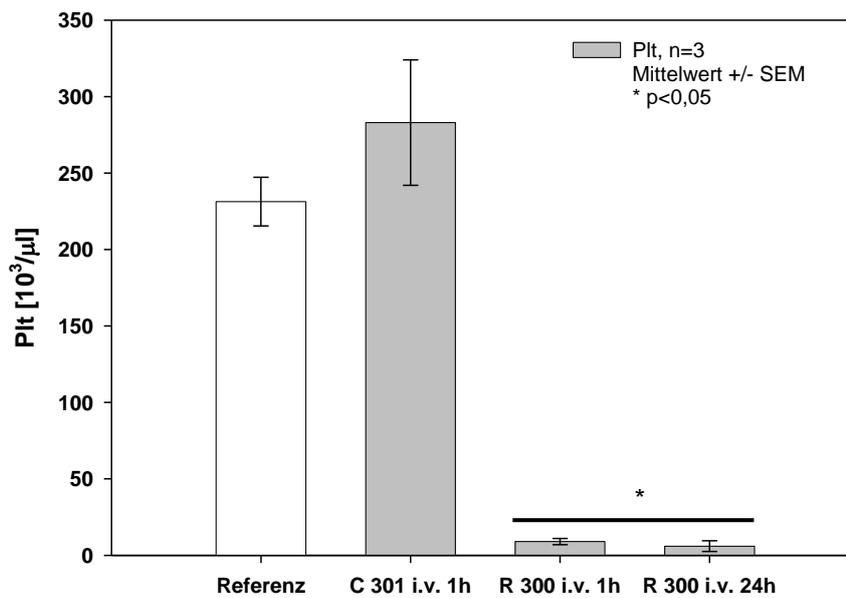
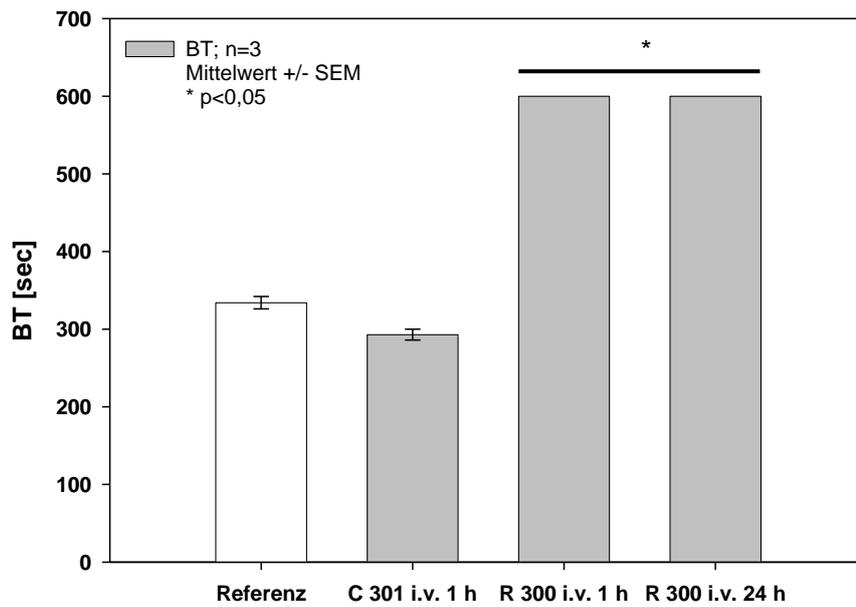


Abbildung 16: Blutungszeit (BT) und Thrombozyten (Plt) 1 h und 24 h nach i.v. Gabe des GPIIb/IIIa-Ak (R 300) bzw. 1 h nach i.v. Gabe des Kontroll-Ak (C 301); Referenz (physiologische Anzahl an Thrombozyten und Dauer der Blutungszeit in einem unbehandelten Kollektiv von n=39 C57/Bl6); SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=3)

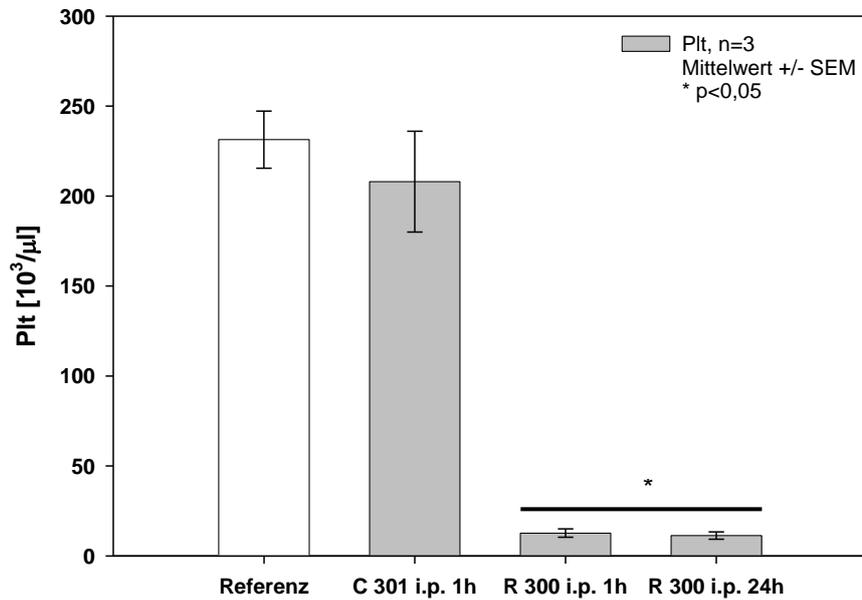
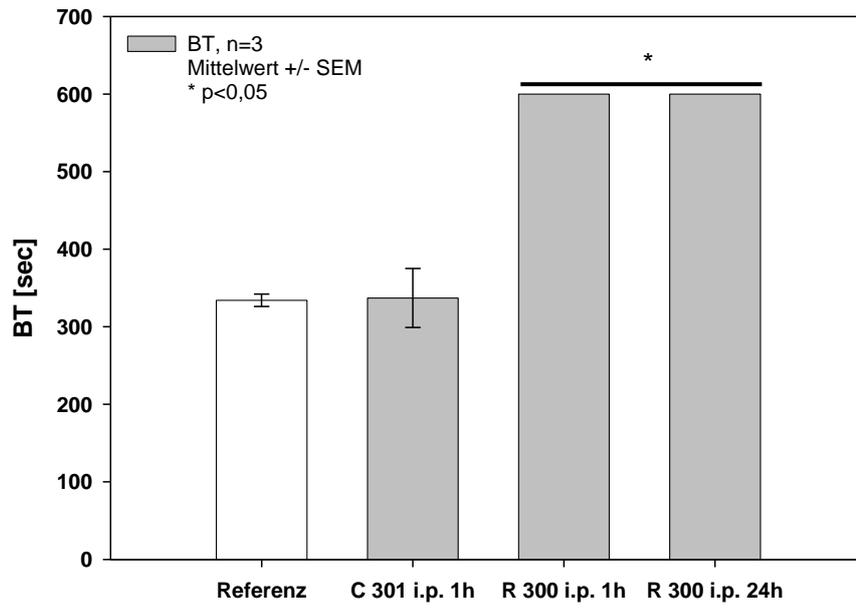


Abbildung 17: Blutungszeit (BT) und Thrombozyten (Plt) 1 h und 24 h nach i.p. Gabe des GPIIb/IIIa-Ak (R 300) bzw. 1 h nach i.p. Gabe des Kontroll-Ak (C 301); Referenz (physiologische Anzahl an Thrombozyten und Dauer der Blutungszeit in einem unbehandelten Kollektiv von n=39 C57/Bl6); SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (n=3)

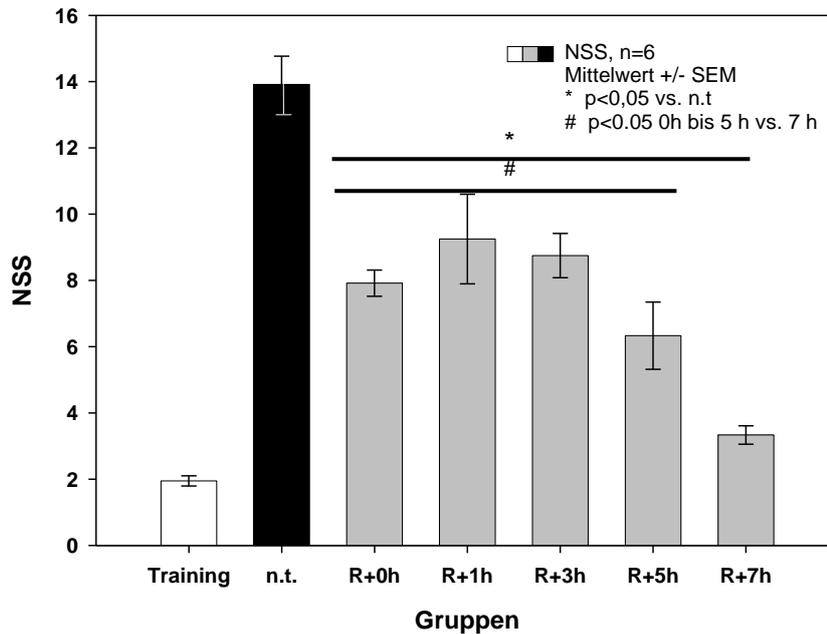


Abbildung 18: Neurologische Funktion gemessen mit dem „neurological severity score“ (NSS) 24 h nach erfolgter MCAO; die einzelnen Interventionsgruppen wurden entsprechend ihres Depletionszeitpunktes relativ zur Reperfusion eingeteilt; das Training erfolgte jeweils einmal täglich über 48 h vor MCAO; n.t. (not treated; keine GPIIb/3-Ak-Gabe); MCAO: Okklusion der A. cerebri media, I: Ischämie, R: Reperfusion; für alle Gruppen gilt: t(I)=45 min und t(R)=24 h (n=6), SEM: Standardabweichung vom Mittelwert

3.3.3 Infarktvolume und intrazerebrale Blutung

In allen Gruppen konnte eine signifikante Verkleinerung ($p < 0,05$) des infarzierten Hirngewebes um bis zu 48% (R+7h) beobachtet werden: Kontrolle $49,3 \pm 1,7 \text{ mm}^3$, R+0h $30,4 \pm 3,1 \text{ mm}^3$, R+1h $35,5 \pm 2,5 \text{ mm}^3$, R+3h $31,7 \pm 2,3 \text{ mm}^3$, R+5h $36,4 \pm 3,9 \text{ mm}^3$, R+7h $25,7 \pm 1,1 \text{ mm}^3$ (Fig. 19a). Bei der histologischen Auswertung fielen in allen Behandlungsgruppen intrazerebrale Blutungen auf (Fig. 19 b).

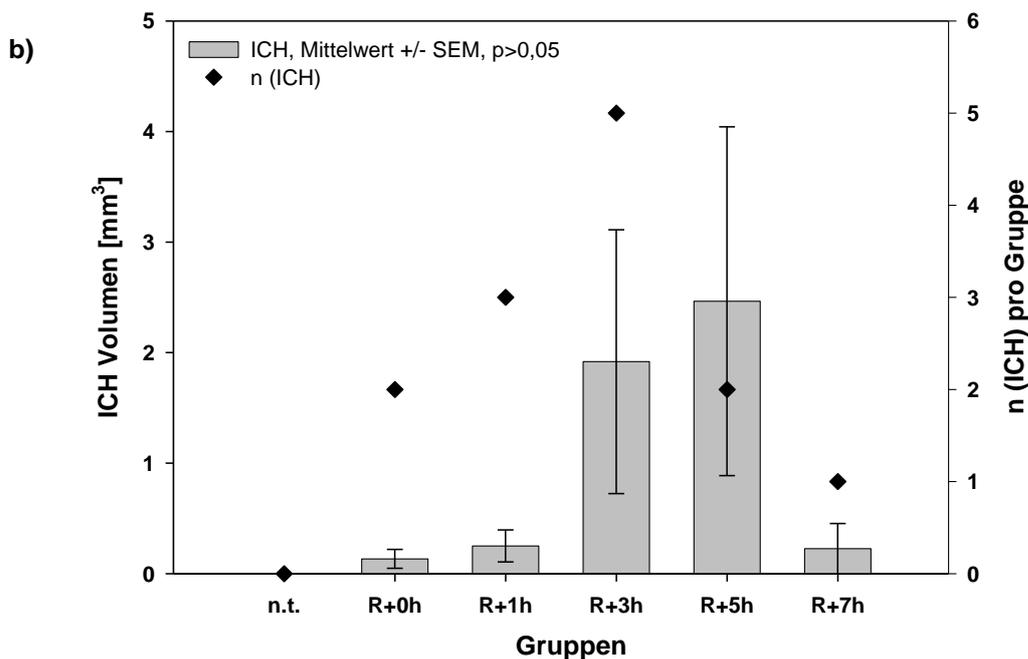
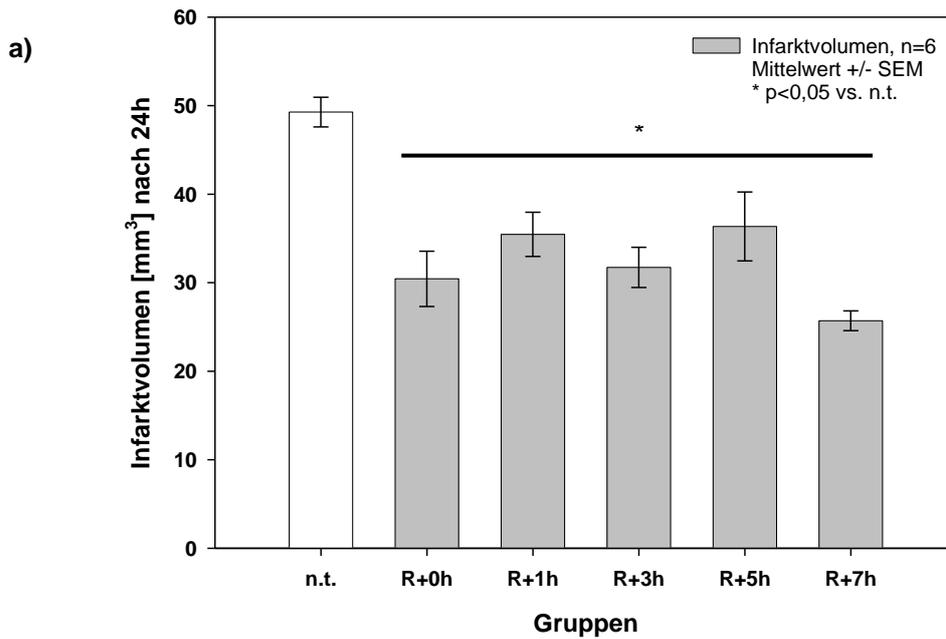


Abbildung 19: a) Infarktvolu­men jeweils 24 h nach MCAO in der nicht behandelten Gruppe und nach erfolgter GPIIb/IIIa-Ak-Gabe; **b)** Volumen (links) und Häufigkeit (rechts) der intrazerebralen Blutungen (ICH) – es zeigen sich deutlich mehr ICH in den Gruppen R+0h, R+1h und R+3h; n.t. (not treated; keine GPIIb/IIIa-Ak-Gabe); die einzelnen Interventionsgruppen wurden entsprechend ihres Depletionszeitpunktes relativ zur Reperfusion eingeteilt; MCAO: Okklusion der A. cerebri media, I: Ischämie, R: Reperfusion; für alle Gruppen gilt: t(I)=45 min und t(R)=24 h (n=6); SEM: Standardabweichung vom Mittelwert

3.3.4 Neuronaler Zelltod

Nach Gabe des GPIIb/IIIa-Ak konnten signifikant weniger ($p < 0,05$) geschädigte Neurone in der postischämischen Hemisphäre in den Gruppen R+5h und R+7h (R+5h: $57,1 \pm 12,4$ Zellen; R+7h: $50,7 \pm 6,9$ Zellen) im Vergleich zur Kontrolle ($144 \pm 21,9$ Zellen) beobachtet werden (Abb. 20). Im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre zeigten sich in allen Gruppen, außer in R+5h signifikant mehr geschädigte Neurone. Die Gruppe R+5h zeigte aber gleichzeitig auch die größten ICH (Abb. 19 b). Die Infarktvolu­mina sind in Abbildung 21 zur besseren Verdeutlichung mit der Entwicklung der geschädigten Neuronen aufgetragen. Abbildung 22 zeigt Beispiele der mikroskopischen Auswertung.

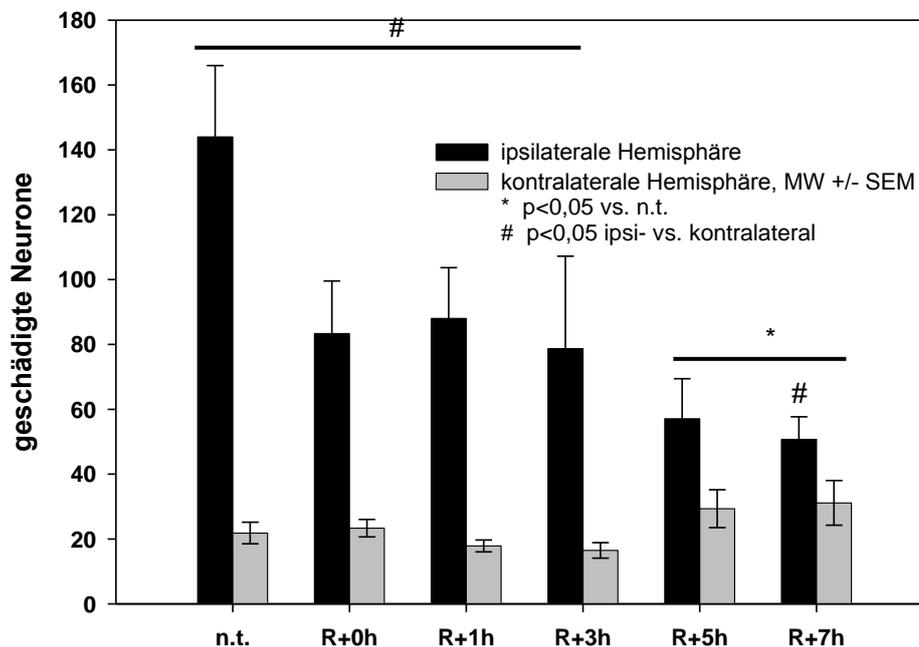


Abbildung 20: geschädigte Neurone in beiden Hemisphären; es zeigen sich signifikant weniger geschädigte Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Tieren in den Gruppen R+5h und R+7h; $p < 0,05$; die einzelnen Interventionsgruppen wurden entsprechend ihres Depletionszeitpunktes relativ zur Reperfusion eingeteilt; n.t. (not treated; keine GPIIb/IIIa-Ak-Gabe); I: Ischämie, R: Reperfusion; für alle Gruppen gilt: t(I)=45 min und t(R)=24 h (n=6); MW: Mittelwert; SEM: Standardabweichung vom Mittelwert

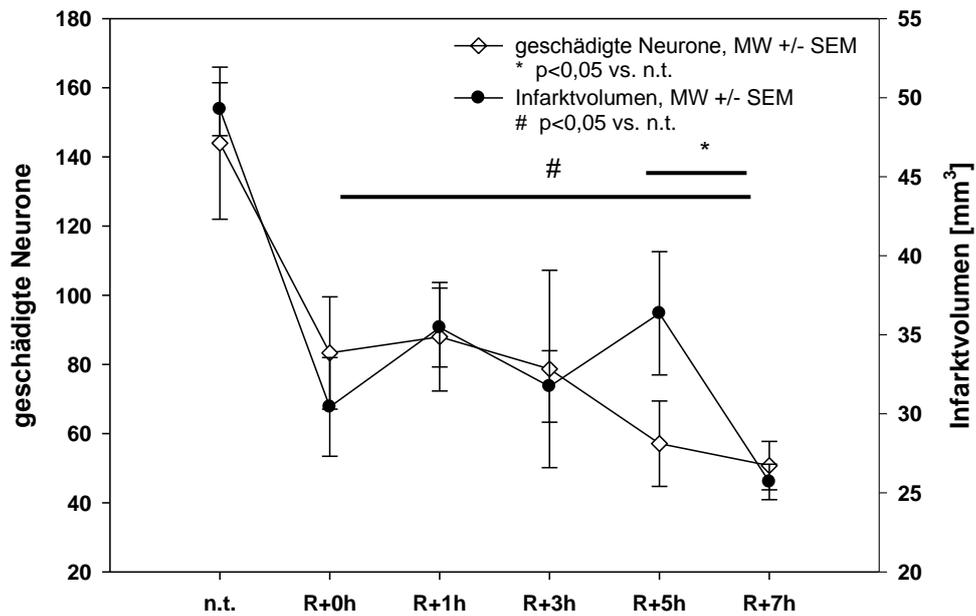


Abbildung 21: Verlauf des Infarktvolumens und der geschädigten Neurone beobachtet in nicht behandelten Tieren und den Interventionsgruppen; die einzelnen Interventionsgruppen wurden entsprechend ihres Depletionszeitpunktes relativ zur Reperfusion eingeteilt; n.t. (not treated; keine GPIIb α -Ak-Gabe); I: Ischämie, R: Reperfusion; für alle Gruppen gilt: t(I)=45 min und t(R)=24 h (n=6); MW: Mittelwert; SEM: Standardabweichung vom Mittelwert

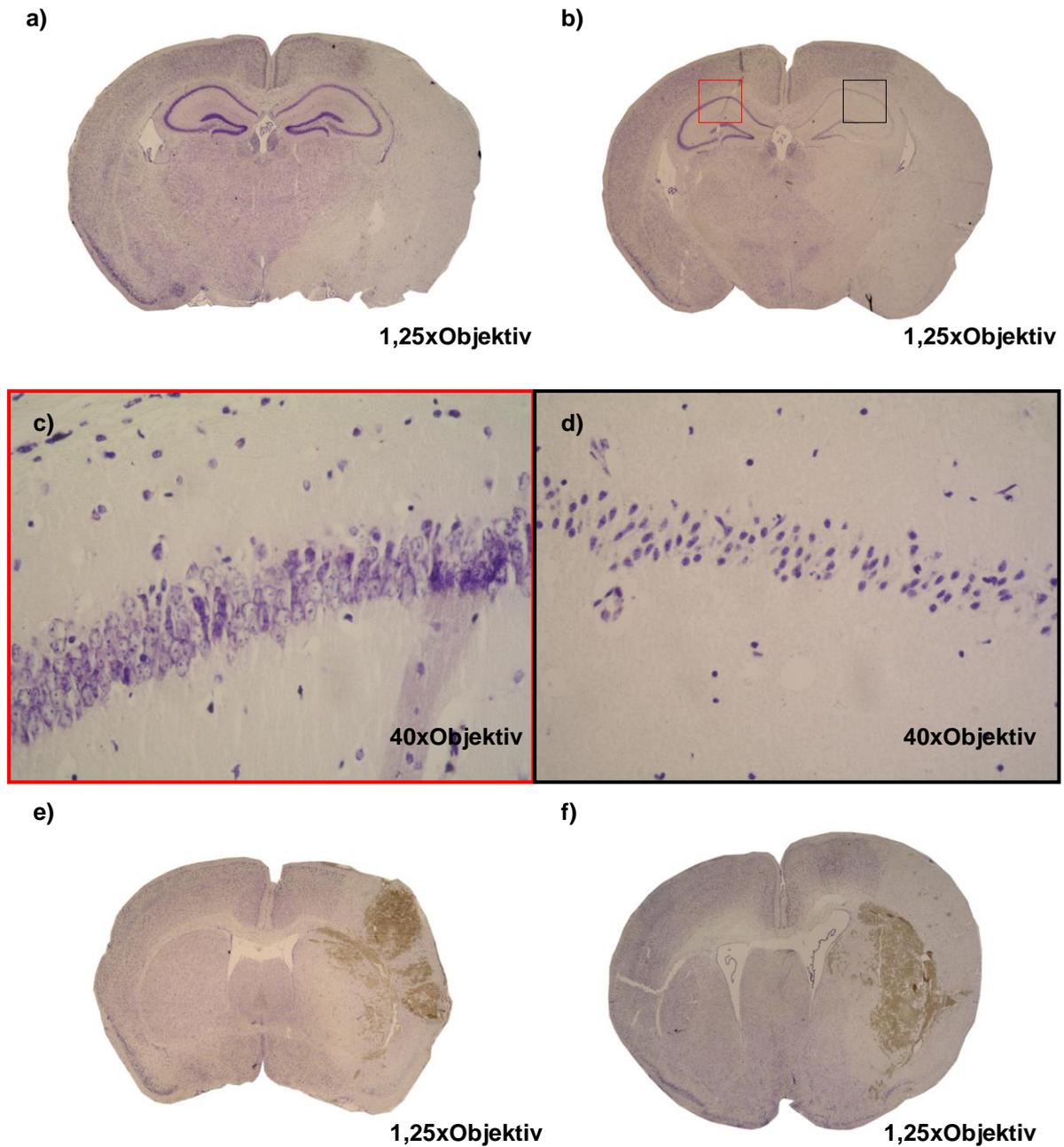


Abbildung 22: a) und b): Beispiele der Schnitte wie sie zur Bestimmung der Fläche (A) des infarzierten Gewebes verwendet wurden; das Volumen (V) wurde anschließend näherungsweise berechnet ($V=b(A_1+A_2+\dots+A_n)$; b: Abstand der Schnitte, n: Anzahl der Schnitte); 1,25xObjektiv; c) und d): ipsi- und **kontra**laterale hippocampale ROI zur Neuronenzählung; 40xObjektiv: c) zeigt vitale und d) geschädigte Zellen; e) und f): Beispiele für die beobachteten ICHs; ROI: region of interest, ICH: intrazerebrale Blutung; die angegebenen Vergrößerungsfaktoren beziehen sich auf das verwendete Objektiv, sie entsprechen nicht der Vergrößerung wie sie hier zu sehen ist.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Experimentelle fokale zerebrale Ischämie

Heutzutage werden die meisten *in vivo* Versuche an kleinen Nagetieren, wie Ratten oder Mäusen, durchgeführt. Im Vergleich zu größeren Tieren, wie Hunde, Katzen oder Primaten, bieten Nagetiere einige wichtige Vorteile: 1) geringere Anschaffungs-, Unterhalts- und Untersuchungskosten, 2) große anatomische und physiologische Konstanz innerhalb eines Stammes, 3) leichtere und schnellere histologische Bearbeitung und 4) größere ethische Akzeptanz von Kleintierversuchen. Zudem sind Mäuse die einzige Tierart, die auf breiter Basis genetisch manipuliert werden kann. Neben den Modellen für Schlaganfälle bei Ratten, haben sich vor allem Mäuse für Untersuchungen der Pathophysiologie des neuronalen Zelltodes nach zerebraler Ischämie etabliert. Ein weiterer Vorteil des Mausmodells liegt in der Methodik der IVM. Mußte man bei Ratten die Dura mater stets eröffnen und künstliches Liquor einbringen, um die kortikalen Gefäße darzustellen, ist dies bei Mäusen, wegen ihrer viel dünneren und transparenten Dura mater, nicht nötig. Somit kann zusätzlichen störenden Faktoren bei der Entstehung des Ischämie/Reperfusionsschadens vorgebeugt werden.

Wie bereits unter 1.1.3.3 angeschnitten, verbesserten viele therapeutische Ansätze die histologischen und neurologischen Ergebnisse in Tiermodellen. Nur ganz wenige Ansätze konnten jedoch einen ähnlichen Vorteil in klinischen Studien beweisen. Experimentelle Versuche in der Schlaganfallforschung unterscheiden sich stark in Qualität und Quantität. Um diesen Umstand entgegen zu treten, wurden 1999 die sogenannten STAIR- (*stroke therapy academic industry roundtable*) Richtlinien empfohlen (STAIR, 1999). Grundlage dafür war die Beobachtung, dass Studiendesign und Ausführungsniveau deutlich die Qualität, Konsistenz und Ergebnisse der Versuche beeinflussten. Mitverantwortlich hierfür sind tierbezogene Variablen (Spezies, Alter, Geschlecht, Komorbidität), anästhesiologische Verfahren, die Güte des Monitorings, Ergebniserhebung, die Güte statistischer Verfahren und letztendlich auch die Wahl des Tiermodells (Ischämiemodell \pm Reperfusion, unterschiedliche Dauer von I/R und Überlebensraten).

Für fokale zerebrale Ischämien stehen insgesamt sechs häufiger verwendete Modelle zur Verfügung, die sich meist auf die MCA und ihr Versorgungsgebiet konzentrieren. Die unterschiedlichen Formen von Schlaganfällen bzw. Ursachen finden sich in Tab. 1. Das Verfahren mit der offensichtlich besten Gültigkeit für thromboembolische Formen des Schlaganfalls ist die Injektion von fibrinreichem, geronnenem Blut. Um thrombolytische Verfahren zu testen, ist dieses Verfahren sicher die erste Wahl, allerdings können Lokalisation und Größe des infarzierten Areals deutlich von Tier zu Tier variieren. Um multiple, heterogene Läsionen zu erzeugen, können kleine Kugeln (ähnlich einem Ultraschallkontrastmittel) in einem Mikroembolienmodell verabreicht werden (Gerriets et al., 2003). Über eine Ligatur oder Elektrokoagulation oberflächlicher, kortikaler Gefäße können gut lokalisierte, kortikale Läsionen gesetzt werden. Hierfür ist allerdings eine mehr oder weniger große Eröffnung des Schädels erforderlich, was zu Veränderungen des ICP führen kann. Daneben besteht die Möglichkeit, über photosensible Farbstoffe eine Aggregation der Thrombozyten zu induzieren – als nicht-invasives Verfahren recht elegant, wird es allerdings wegen fehlender klinischer Relevanz wenig eingesetzt. Gut lokalisierte und reproduzierbare Läsionen können auch mit vasokonstriktorisch wirksamem Endothelin, welches topisch verabreicht wird, erzielt werden (Macrae, 1992).

Das am häufigsten verwendete Verfahren, um thromboembolische Schlaganfälle zu induzieren, ist das intraluminale Fadenokklusionsmodell. Auch hier können reproduzierbare, permanente oder transiente fokale Ischämien in relativ kurzer Zeit gesetzt werden. Dadurch ist es möglich, Therapieverfahren für akute Schlaganfälle oder Langzeitinterventionen zu testen und miteinander zu vergleichen. Wie bereits oben beschrieben, wird die Rate an reproduzierbaren Schlaganfällen über eine Steigerung der Okklusionseffektivität erzielt. Hierfür werden die Fäden, wie in unserer Arbeitsgruppe mit Silikon (Hara et al., 1996; Schmid-Elsaesser et al., 1998; Plesnila et al., 2001; Kataoka et al., 2004) oder auch Polylysin (Belayev et al., 1996) ummantelt. Vor allem bei Ratten konnte gezeigt werden, dass solche Fäden nicht immer nur das von der MCA versorgte Gebiet okkludieren (Kanemitsu et al., 2002). Dies kann durch eine begleitende Ischämie des Hypothalamus zu einer Hyperthermie als Störfaktor bei der Auswertung der Ergebnisse führen (Zhao et al., 1994; Abraham et al., 2002; Gerriets et al., 2003). In Ratten konnte über Veränderungen des Fadendesigns selektiv die MCA ohne Mitinfarzierung des

Hypothalamus und des präoptischen Areals okkludiert werden (Ma et al., 2006). Mit dieser Maßnahme konnten die Überlebensintervalle vergrößert werden. Eine entsprechende Übertragung dieses Fadendesigns auf eine für Mäuse passende Größe, findet sich zurzeit noch nicht. Wir beobachteten in unseren Versuchen während des Temperaturmonitorings allerdings keine Hyperthermien, weder beim Setzen der Okklusion, noch beim Ziehen des Fadens oder während der IVM. Die Temperatur wurde konstant auf $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ gehalten. Auf Grund späterer IVM-Untersuchungen war es notwendig, die Dura mater intakt zu lassen. Somit schieden für unsere Experimente oben genannte Methoden, die mit einer Eröffnung des Neurokraniums einhergehen, aus. Dies hatte den Vorteil, dass während Ischämie und Reperfusion die Komplikationsrate durch subdurale Hämatome, Störungen der Liquorzirkulation und direkte Schäden am Hirnparenchym selbst vorgebeugt werden konnte. Nach der oben beschriebenen Standardisierung der MCAO mit einem Variationskoeffizienten von 18% konnte von der Reproduzierbarkeit der Methode ausgegangen werden.

Da Größe und Effektivität der Ischämie von der Fadengröße abhängt (Hata et al., 1998), verwendeten wir Fäden in relativ zum Körpergewicht der Versuchstiere passender Größe. Daneben variiert das Infarktvolumen stark mit der Ischämiezeit selbst (Garcia et al., 1995). So zeigten Ratten nach einer Ischämie von 30 Minuten nur diskrete neurologische Ausfälle und erholten sich nach 7 d wieder – entsprechend zeigten Ischämiezeiten von 60 Minuten schlechtere Resultate. Am schlechtesten schnitten die Ratten ab, die einer permanenten Ischämie unterzogen wurden. Gleichzeitig verdoppelte sich die Anzahl nekrotischer Neurone in den Gruppen I = 30 und 60 Minuten. Wie oben beschrieben, sterben nicht alle Neurone sofort nach Verlegung der Blutversorgung ab, sondern es befinden sich um den nekrotischen Kern potenziell funktionsfähige, z.Z. aber inaktive Zellen der Penumbra. Da wir den Reperfusionsschaden nach Ischämie beobachten wollten, war es wichtig, diese Penumbra möglichst groß zu halten. Eine Ischämiezeit von 45 Minuten war, wie unsere Arbeitsgruppe schon zuvor zeigen konnte (Plesnila, 2004), ein guter Mittelweg.

Abschließend soll noch einmal auf die Vorteile von Schlaganfällen bei Nagetieren eingegangen werden: Sie zeigen die Konsequenzen ischämischer Insulte recht nah an den pathophysiologischen Veränderungen im menschlichen Gehirn auf (Zivin and Grotta, 1990). Bei Menschen variieren Schlaganfälle in ihrer Stärke,

Lokalisation, Ursache und dem Ausmaß der Reperfusion – ganz abgesehen von den meist bestehenden Komorbiditäten. In experimentellen Modellen, wie unserem hingegen, können all diese Störfaktoren minimiert werden. Benutzt man dazu nur einen Stamm (z.B. C57/Bl6), so können auch die anatomischen Variationen der hirnersorgenden GefäÙe kontrolliert werden (Durukan et al., 2008).

4.1.2 Anästhesie

4.1.2.1 Neuroprotektive Effekte

Die neuroprotektive Wirkung von anästhesiologischen Medikamenten beruht meist auf einer Verminderung des zerebralen Metabolismus, der Prävention von epileptischen Anfällen und einer Drosselung des Sympathikotonus. Bei der Verwendung von nicht – volatilen Anästhetika wirkt sich außerdem ihre meist hirndrucksenkende Wirkung günstig auf die geschädigten Neurone aus (Thal et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass Isofluran, als volatiles Anästhetikum, der Entstehung freier Radikale und der Akkumulation von intrazellulärem Kalzium entgegenwirkt (Gray et al., 2005). So konnte Isofluran, wenn es vor der zerebralen Ischämie gegeben wurde, die InfarktgröÙe in experimentellen Studien verkleinern und die neurologischen Ergebnisse verbessern (Zheng and Zuo, 2004; Zhao and Zuo, 2004). Ob diese Effekte volatiler Anästhetika auch über längere Zeit zu beobachten sind, ist dabei jedoch fraglich. Ratten, denen Isofluran gegeben und die einer fokalen zerebralen Ischämie unterzogen wurden, zeigten weniger nekrotische Zellen nach zwei Tagen im Vergleich mit einem nicht behandelten Kontrollkollektiv. Zwei Wochen nach Ischämie zeigten beide Gruppen keinen signifikanten Unterschied mehr (Kawaguchi et al., 2000). Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass inhalative Anästhetika in experimentellen Schlaganfallmodellen dosisabhängig die Ergebnisse negativ beeinflussen können. Gleichzeitig liegt jedoch schon die Dosis, um neuroprotektive Effekte zu erzielen, innerhalb versuchsrelevanter Mengen (Nasu et al., 2006). Die neuroprotektive Wirkung von Isofluran ist auch bei Schädel-Hirn-Trauma (SHT) Versuchen an Ratten zu beobachten: So zeigen Tiere, die vor und nach dem SHT Isofluran erhielten, neben besseren Ergebnissen in moto-neurologischen Verhaltenstests, auch höhere Überlebensraten als mit Fentanyl behandelte Ratten (Statler et al., 2006b). Eine andere Studie untersuchte die Überlebensraten und die neurologischen Ergebnisse nach SHT an Ratten, die mit sieben unterschiedlichen Narkotika behandelt wurden. Auch hier schnitt die mit

Isofluran behandelte Gruppe am besten ab (Statler et al., 2006a). Bis jetzt konnten jedoch keine neuroprotektiven Effekte inhalativer Anästhetika am Menschen nachgewiesen werden (Fukuda and Warner, 2007). Da inhalative Anästhetika somit potenziell neuroprotektive oder auch schädigende Wirkungen auf das zentrale Nervensystem (ZNS) haben und somit als Störgröße in die Ergebnisse mit eingehen könnten, war es für die MCAO – Präparation wichtig, die OP-Zeiten so kurz wie möglich zu halten (optimal weniger als 25 Minuten).

Um den schädigenden Einfluss der inhalativen Anästhetika auf den Stoffwechsel des Gehirns zu mindern, griffen wir in den IVM Versuchen auf die oben beschriebene i.p.-Narkose zurück. In Vorversuchen aus unserer Arbeitsgruppe konnten wir zum Einen ihre gute Steuerbarkeit nachweisen, zum Anderen aber auch eine Narkoseform entwickeln mit der Versuche von bis zu 6 h an Mäusen möglich waren (Thal and Plesnila, 2007).

4.1.2.2 Körpertemperatur

Einer milden Hypothermie werden neuroprotektive Eigenschaften sowohl nach SHT, als auch nach ischämischen Insulten zugesprochen. Die genauen Mechanismen sind immer noch nicht gänzlich geklärt, allerdings scheint, dass der zerebrale Stoffwechsel und die Freisetzung exzitatorischer Transmitter herabgesetzt werden (Zausinger et al., 2003b; Thal et al., 2005). Ebenfalls ist bekannt, dass während und nach anästhesiologischer Maßnahmen, Mäuse eine gestörte Temperaturoautoregulation zeigen (Thal and Plesnila, 2007). Um diesen beiden Störgrößen vorzubeugen, verwendeten wir eine rückkopplungskontrollierte Heizmatte. Damit konnten wir Körpertemperaturen von $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ während allen Versuchen gewährleisten. Gleichzeitig verblieben die Tiere bis zum Wiedererreichen spontaner motorischer Aktivität in einem Brutkasten bei 36°C .

4.1.3 Thrombozytenpräparation

Zur Isolation und Anfärbung der Thrombozyten entschieden wir uns für ein bei uns bereits etabliertes Verfahren (Massberg et al., 1998; Manegold et al., 2003). Eine Maus von 25 g KG hat etwa 1,75 ml (7% KG) Blut bei einer Thrombozyten – Anzahl von $400 - 600 \times 10^3/\mu\text{l}$ (abhängig vom Tierstamm). Dem entsprechend beträgt die Gesamtanzahl an Thrombozyten etwa $700 - 1050 \times 10^6$. Allen Tieren wurden ca. 100×10^6 Thrombozyten verabreicht, was ca. 10,5 – 14% der Gesamtthrombozytenanzahl entspricht. Die Reinheit der Thrombozyten wurde stets

vor der Applikation mittels Coulter Counter überprüft. Ähnlich wie die MCAO wurde auch die Entnahme der Thrombozyten standardisiert, mit dem Ziel, möglichst atraumatisch zu arbeiten und so einer möglichen Aktivierung der Thrombozyten vorzubeugen. Diese wurde zudem vor Applikation mittels durchflusszytometrischer Analysen überprüft (Daten nicht gezeigt) (Manegold et al., 2003). Die Thrombozyten wurden stets zeitnah zu den IVM Versuchen isoliert und angefärbt, so dass lange Lagerungszeiten und somit ein Zerfall der Thrombozyten ausgeschlossen werden konnte. Selbstverständlich wurde nach der Anfärbung und der gesamten weiteren Präparation auf Lichtschutz geachtet.

4.1.4 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie erlaubt, im Gegensatz zu angiographischen und histologischen Methoden, die Untersuchung zerebrovaskulärer Effekte und die Interaktion intravaskulärer Zellen mit dem Endothel in lebenden Organismen. Außerdem können gleichzeitig mehrere verschiedene Parameter überwacht werden, wie z.B. Blutdruck, CBF und Blutgase. Die zur Epiillumination in der IVM (s.o.) verwendeten Farbstoffe haben keinen Einfluss auf mikrozirkulatorische oder physiologische Parameter (Kataoka et al., 2004). Mit der IVM können im Bereich des kortikal lokalisierten Parenchyms der Penumbra einfach und schnell venöse, kapilläre und arterielle Gefäße aufgesucht und in ihrem Verlauf kontinuierlich verfolgt werden.

Daneben gibt es jedoch auch Nachteile und Grenzen der IVM: Vor allem können ausschließlich oberflächliche, kortikale Gefäße beobachtet werden. Gerade nach MCAO können somit Gebiete im ischämischen Kerngebiet (z.B. Striatum) nicht dargestellt werden. Hier fehlen starke Kollateralen und somit zeigt die regionale Durchblutung in diesem Gebiet andere Charakteristika. Unterschiede im Thrombozytenverhalten und der Entzündungsreaktion zwischen oberflächlichen und tiefen Hirnregionen müssen somit bedacht werden, auch wenn sie bisher nicht nachgewiesen werden konnten. Dies mag von geringerer Relevanz sein, wenn man, wie in der vorliegenden Arbeit, an der PEI in der Penumbra, die oberflächlich den ischämischen Kern umschließt, interessiert ist.

Im Gegensatz zu größeren Tieren, wie Ratten, ist es bei Mäusen nicht mehr nötig, die Dura mater zu eröffnen (Ishikawa et al., 2003). Somit können oberflächliche kortikale Gefäße in optimaler Qualität dargestellt werden. Damit ist es sehr unwahrscheinlich, dass durch die Präparation die Mikrozirkulation und damit die

Thrombozyten stark beeinflusst werden. Die Untersuchungsmethode an Mäusen wurde in unserem Labor im Rahmen von LEI nach zerebraler Ischämie bereits beschrieben (Kataoka et al., 2004).

4.1.5 Thrombozytendepletion

Sowohl nach i.v., als auch nach i.p. Applikation des Antikörpers konnte ein Rückgang der Thrombozyten um >95% bereits nach 1 h beobachtet werden. Beide Applikationsarten wurden von Blutungszeiten von über 10 Minuten begleitet. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen nach Anwendung des gleichen Antikörpers (Bergmeier et al., 2000; Kleinschnitz et al., 2007). Somit konnten wir davon ausgehen, dass auch die technisch einfachere und bei der Maus zuverlässigere i.p. Applikation von Antikörper den erwünschten Effekt erzielt. Sowohl nach i.v., als auch nach i.p. Applikation des GPIIb/IIIa-Antikörpers konnte eine Zunahme des Milzgewichtes beobachtet werden (GPIIb/IIIa-Ak i.p. 1 h: $58,8 \pm 1,7$ mg, GPIIb/IIIa-Ak i.p. 24 h: $71,9 \pm 5,8$ mg, $p > 0,05$; GPIIb/IIIa-Ak i.v. 1 h: $62,1 \pm 1,2$ mg, GPIIb/IIIa-Ak i.v. 24 h: $74,5 \pm 4,9$ mg, $p > 0,05$). Dies könnte Ausdruck eines gesteigerten Abbaus der Thrombozyten durch Phagozyten im Milzsinus sein.

4.1.6 Neurologische Evaluation

Wie bereits in Tabelle 2 dargestellt, umfasst der NSS neben physiologischen Verhaltensweisen, auch Koordinationsfähigkeit und Motorfunktionen der operierten Tiere. Wenn man sich die Gewichtung der Parameter des NSS ansieht, erkennt man, dass dieser beide Qualitäten mit einer fast gleichen Anzahl von Subtests erfasst (Stahel et al., 2000). Der Vorteil des NSS ist seine leichte, schnelle und für die Tiere schonende Durchführbarkeit. Bekannt ist, dass Mäuse sich schnell unterschiedlichsten Testbedingungen anpassen können und gleichzeitig eine sehr steile Lernkurve zeigen. Um dies als mögliche Störung auszuschließen, wurden die Tiere über zwei Tage an den Test gewöhnt und trainiert (Zweckberger et al., 2003). Da durch die Okklusion nur einer MCA auch nur eine Hemisphäre von ischämischen Veränderungen betroffen war, eignete sich die Entität „Schwebebalken“ sehr gut, um diese Schäden anhand des Hinterlaufs der Maus zu beobachten. Im Vergleich zu den Vorderläufen, wird die hintere Extremität der Mäuse immer nur von der kontralateralen Hemisphäre kontrolliert. Somit bildete die Anzahl der Fehlschritte das Ausmaß des Schadens gut ab. Da der NSS aber auch komplexere Hirnfunktionen abbildet (Such- und Weckreaktion), ist er für das Ausmaß der infarzierten Läsion

sowie einer gleichzeitig bestehenden diffusen Hirnschädigung und somit für eine allgemeine neurologische Evaluation der Tiere gut geeignet.

4.2 Thrombozyten und zerebraler Reperfusionsschaden

4.2.1 Thrombozyten-Endothelinteraktion nach zerebraler Ischämie

Es finden sich nur wenige wissenschaftliche Arbeiten über Interaktionen zwischen dem Endothel und intravaskulären Zellen nach experimenteller zerebraler Ischämie – und noch weniger über PEI (Ishikawa et al., 2004; Ishikawa et al., 2005; Terao et al., 2008a; Terao et al., 2008b).

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir nach unserem Kenntnisstand, zum ersten Mal den genauen zeitlichen Verlauf (R=1 h, 3 h, 5 h, 12 h und 24 h) der PEI aufdecken. Die oben genannten Publikationen konzentrierten sich dagegen lediglich auf Reperusionszeiten von 1 h bzw. 4 h nach unterschiedlichen Ischämiezeiten.

Bei unseren Experimenten beobachteten wir eine signifikante Zunahme rollender Thrombozyten in den ersten 5 h nach zerebraler Ischämie gegenüber der Kontrolle im venösen Gefäßbett (siehe auch 3.2.2). Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, wenn auch die absolute Anzahl um den Faktor 10 kleiner war, zeigten adhärenente Thrombozyten im postkapillären System. Außer nach einer Reperusionszeit von 3 h, beobachteten wir im arteriellen Gefäßbett keine signifikante Zunahme rollender oder adhärenenter Thrombozyten (rollende Plt 3 h: $1,36 \pm 0,24$ Plt vs. Kontrolle: $0,19 \pm 0,10$ Plt, $p < 0,05$).

Diese Beobachtungen bestätigen nur zu einem Teil die Ergebnisse von Ishikawa et al. (Ishikawa et al., 2004). Diese Arbeitsgruppe beschrieb eine signifikante Zunahme rollender und adhärenenter Thrombozyten in postkapillären Venolen nach I/R=1 h/4 h, nicht aber nach I/R=1 h/1 h oder I/R=30 min/4 h. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb 2008 auch signifikant mehr PEI nach I/R=30 min/4 h, jedoch unter einem veränderten Narkoseprotokoll (Terao et al., 2008a). Der zeitliche Verlauf von PEI deckt sich grob mit unseren Daten: zwischen R=1 h und 4 h kommt es zu einer Zunahme rollender und adhärenenter Thrombozyten. Das Ausmaß an adhärenenten Thrombozyten von ca. $200/\text{mm}^2$ konnten wir nicht beobachten. Zu beachten ist aber in diesem Zusammenhang, dass in allen obengenannten Arbeiten die Anzahl der intravaskulären Zellen pro mm^2 angegeben werden, also extrapoliert von der tatsächlich beobachteten Anzahl.

Auch in extrazerebralem Gewebe konnte eine zeitabhängige Zunahme der PEI nach ischämischen Schädigungen nachgewiesen werden. So beobachtete man nach experimenteller intestinaler Ischämie eine maximale Zunahme der PEI nach R=4 h (Cooper et al., 2003). Daneben wurde eine Zunahme von PEI nach I/R in weiteren Organen beschrieben, wie z.B. dem Dünndarm (Massberg et al., 1998; Cooper et al., 2003), der Retina (Nishijima et al., 2001) und der Leber (Khandoga et al., 2002).

Neben Leukozyten, sind auch Thrombozyten als „inflammatorische“ Zellreihe beschrieben worden (Weyrich et al., 2003). Deshalb wollten wir in einer zweiten Versuchsreihe PEI nach Depletion von >95% der Thrombozyten untersuchen. Durch die erheblichen Komplikationen waren die deutlich aufwändigere Präparation und letztendlich auch die Durchführung der IVM - Versuche unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Wie in der Einleitung beschrieben, spielt GPIIb eine zentrale Rolle für die initial lockere Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel und subendotheliale Strukturen. Um trotz der Komplikationen in der IVM genauere Aussagen über die Bedeutung von Thrombozyten am Reperfusionsschaden nach zerebraler Ischämie machen zu können, führten wir oben beschriebene Versuche zur funktionellen und histomorphologischen Evaluation nach MCAO zu den Zeitpunkten mit den höchsten PEI durch.

4.2.2 Funktionelle und histologische Evaluation nach MCAO und Depletion

Ähnlich dem zeitlichen Verlauf der PEI, zeigte sich eine deutliche funktionelle Verbesserung, evaluiert anhand des NSS in allen behandelten Tieren (Abb.18). So zeigten sogar diejenigen Tiere eine bessere neurologische Funktion, die erst nach MCAO mit dem Antikörper behandelt wurden. Die Gruppe R+7h hatte nicht nur signifikant weniger neurologische Beeinträchtigungen als die Kontrollgruppe, sondern auch deutlich weniger als alle anderen behandelten Tiere. Dieses Bild spiegelt sich auch in den infarzierten Volumina wider. So konnte eine Reduktion der histopathologisch messbaren Läsion auf bis zu 52% (R+7h) erzielt werden. Dies geht einher mit einem signifikanten Rückgang geschädigter Neurone im infarzierten Areal (Abb. 19 und 20). Diese Ergebnisse bestätigen eine Arbeit von Kleinschnitz et al. (Kleinschnitz et al., 2007), bei der mit ähnlichen Versuchsprotokollen die Auswirkungen eines GPIIb/IIIa-, eines GPVI- und eines GPIIb/IIIa-Ak auf Infarktvolume und neurologisches Outcome untersucht wurden. Allerdings fielen bei der

Auswertung unserer Versuche ICH in allen Therapiegruppen auf (Abb. 19). Vor allem 1, 3 und 5 h nach Reperfusion zeigten sich die meisten und am größten ausgedehnten ICH. Somit konnten wir die beschriebene 100%ige Sicherheit des Antikörpers in Hinblick auf ICH nicht bestätigen. Das Auftreten von ICH als Komplikation im Rahmen der Depletion könnte als Ursache betrachtet werden, warum die späte Applikation des Antikörpers einen zusätzlichen protektiven Effekt hat oder dieser suggeriert wird. Unter Umständen ist das zerebrovaskuläre Endothel in den frühen Stunden der Reperfusion besonders anfällig, wodurch die Entstehung ICH gefördert werden könnte. Die deutliche funktionelle Verbesserung spricht für einen protektiven Effekt des Antikörpers und die Bedeutung von GPIIb/IIIa vermittelter PEI für den neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie (Kleinschnitz et al., 2007; Stoll et al., 2008). In der genannten Arbeit von Kleinschnitz et al. wurde das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von ICH (Kleinschnitz et al., 2007) mit einem Kleintier-MRT untersucht. Inwieweit die Auflösung des verwendeten Gerätes zur definitiven Klärung der Frage ausreichend war, ist dem Artikel nicht zu entnehmen.

4.2.3 Bedeutung von PEI, LEI und GPIIb für den neuronalen Zelltod

Das zerebrale Gefäßbett reagiert mit einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Freilegung der subendothelialen Matrix sehr schnell auf zerebrale Ischämien (del Zoppo and Mabuchi, 2003). Wie in der Einleitung beschrieben, ist für die frühe, aber immer noch lockere Adhäsion von Thrombozyten am Endothel die Interaktion von thrombozytärem GPIIb/IIIa und endotheliale vWF (Andrews et al., 2004) verantwortlich. Für die spätere, feste Adhäsion ist u.a. die Interaktion von thrombozytärem GPIIb/IIIa und Kollagen ursächlich (Stoll et al., 2008).

Der oben beschriebende Verlauf von PEI (Abb. 10) in postkapillären Venolen ist fast identisch mit Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zu LEI nach zerebraler Ischämie (Kataoka et al., 2005): so kommt es zu einer maximalen Zunahme der LEI nach einer Reperfusion von 5 h und, ganz wie in der vorliegenden Arbeit, zu einem Rückgang auf das Ausgangsniveau nach mehr als 9 h. Gleichzeitig fand sich erst nach neunstündiger Reperfusion eine zunehmende Einwanderung von Leukozyten in das infarzierte Parenchym (Kataoka et al., 2005). Die Leukozyten treten folglich erst nach einer bereits vorhandenen Nekrose im Parenchym auf und dann auch nur in äußerst geringer Zahl (3 Leukozyten/200 Neurone). Das Paradigma, dass nur intraparenchymale Leukozyten für das Absterben von Neuronen innerhalb der

postischämischen Reperfusionphase verantwortlich sind, scheint deshalb nur wenig haltbar (Hayward et al., 1996; Emerich et al., 2002; Kataoka et al., 2005).

GPIb α vermittelt die Interaktion von Thrombozyten und endotheliale vWF. Durch Verwendung des Antikörpers verlängert sich die Blutungszeit und die Anzahl der Thrombozyten nimmt ab. So kommt es insgesamt zu weniger PEI, was die mikrozirkulatorischen Verhältnisse im infarzierten und angrenzenden Hirnparenchym erheblich verbessert, mit der Folge eines verbesserten CBF. Reversible Durchblutungsverringierungen werden auch nach experimentell induzierter arterieller Thrombose in Pavianen durch die Verwendung von monoklonalen GPIb-Ak beschrieben (Cauwenberghs et al., 2000; Wu et al., 2002). In diesem Sinne können unsere Beobachtungen, dass alle behandelten Tiere sowohl funktionell, als auch histomorphologisch bessere Ergebnisse als die Kontrollgruppe erzielten, erklärt werden.

Der neuroprotektive Effekt von GPIb α -Ak wurde bereits von Kleinschnitz et al. nach einer Reperusionszeit von 1 h nach MCAO beschrieben (Kleinschnitz et al., 2007). Wir konnten dagegen zum ersten Mal zeigen, dass sich dieser Effekt sogar ausbauen lässt, wenn der Antikörper 4 bzw. 6 h nach MCAO verabreicht wird. Wie bereits oben beschrieben, bleibt zu klären, inwiefern diese Beobachtung durch die Verteilung von ICH in den einzelnen Gruppen im Sinne einer Komplikation oder als möglicher Ausdruck eines fragilen zerebrovaskulären Endothels in den frühen Stunden der Reperfusion zu bewerten ist. Gleichzeitig könnten die aktuellen Ergebnisse auf ein bisher unbekanntes, klinisch relevantes, spät einsetzendes therapeutisches Fenster von Thrombozytenaggregationshemmern hindeuten.

Thrombozyten modulieren die Interaktion von Leukozyten mit anderen Thrombozyten und dem Endothel und verstärken damit die durch I/R verursachte, leukozytäre Immunantwort (Salter et al., 2001; Gawaz, 2004; Zarbock et al., 2007). Dabei interagieren Thrombozyten mit Leukozyten über verschiedene Rezeptoren, wie z.B. GPIb-V-IX und Mac-1 oder P-Selektin und PSGL-1 (siehe Abb. 2) (Zarbock et al., 2007). Nachdem Thrombozyten am Endothel adhären, können sie in einem zweiten Schritt nicht nur weitere Thrombozyten, sondern auch Leukozyten „einfangen“ und somit als wichtige Verstärker und Modulatoren einer akuten Entzündungsreaktion dienen. Dass P-Selektin eine zentrale Bedeutung für die

Interaktion intravaskulärer Zellen mit dem Endothel hat, konnte sowohl nach zerebraler, als auch extrazerebraler I/R nachgewiesen werden (Massberg et al., 1998; Ishikawa et al., 2003; Ishikawa et al., 2004). So konnten Ishikawa et al. neben direkten Interaktionen der beiden Zellreihen mittels IVM, auch mit Thrombozyten bepackte, über das Endothel rollende Leukozyten beobachten (Ishikawa et al., 2004). Die Bedeutung der Interaktionen dieser beiden Zelltypen untereinander und mit dem Endothel wird auch durch Beobachtungen in CD40^{-/-} und CD40-Ligand^{-/-} Mäusen gestützt (Ishikawa et al., 2005). CD40 spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen entzündlicher Veränderungen als Induktor zellulärer Adhäsionsmoleküle (Omari and Dorovini-Zis, 2003) und endotheliales Gewebefaktor durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Henn et al., 1998; Monaco et al., 2002). Erhöhte Werte von CD40-Ligand werden mit vielen (pro)thrombotischen Erkrankungen wie Hypercholesterinämie, Diabetes, ischämischen Schlaganfall und dem akuten Koronarsyndrom assoziiert und stehen hier beispielsweise im Zusammenhang mit erhöhten Restenoseraten nach PCI (Garlichs et al., 2001; May et al., 2002; Garlichs et al., 2003; Kopp et al., 2003; Heeschen et al., 2003; Sanguigni et al., 2005; Cipollone et al., 2005). Der Ligand von CD40 soll auf Thrombozyten, der Rezeptor auf Monozyten exprimiert sein (Cha et al., 2003; Garlichs et al., 2003). Die Knock-out-Mäuse zeigten signifikant weniger LEI und PEI bei deutlich kleineren Infarkt volumina. Die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten konnte durch anti-CD40L oder anti-Mac-1 Antikörper gehemmt werden, was die Bedeutung von beiden Oberflächenmarkern und Mac-1 im Besonderen für PLEI unterstreicht (Andrews et al., 2003; Andrews et al., 2004; Li et al., 2008). Beide Vorgänge, also die Verstärkung der LEI über Mac-1 und die Hochregulation von P-Selektin wirken bei der Entstehung und Verstärkung des Reperfusionsschadens mit (Ishikawa et al., 2003; del Zoppo and Mabuchi, 2003; Ishikawa et al., 2004) und sind thrombozytär GPIIb α vermittelt.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können zwei Schlüsse bezüglich der Rolle von Thrombozyten am neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie gezogen werden:

- 1) Analog ihrer Funktion innerhalb der Blutgerinnung, sind Thrombozyten an der Verlegung der betroffenen Gefäße nach einem Schlaganfall beteiligt. Das ischämisch

veränderte zerebrale Endothel trägt durch seine prothrombotischen Eigenschaften (del Zoppo and Mabuchi, 2003) zur weiteren Adhäsion von Thrombozyten bei und weitere Thrombozyten werden aktiviert. Dadurch wird der CBF verringert und die Neurone im ischämischen Kern und der umgebenden Penumbra werden nicht ausreichend mit Blut versorgt.

Werden die Thrombozyten aus diesem System entfernt, so können weniger Gefäße im Rahmen der Reperfusion verlegt werden, was zu einer besseren Sauerstoffversorgung des infarzierten Areals und der umgebenden Penumbra führt. Dies erklärt, warum alle mit dem GPIIb/IIIa-Ak behandelten Tiere bessere funktionelle und histomorphologische Ergebnisse erzielten. Ein etwas ähnlicher, wenn auch weniger ausgeprägter Effekt wird auch durch GPVI-Ak erzielt (Kleinschnitz et al., 2007). Allerdings interagiert GPVI nicht mit Leukozyten. Deshalb kann die Beobachtung des zeitlich gestaffelten, protektiven Effektes des Antikörpers im Zusammenhang mit dem beschriebenen Verlauf der PEI und LEI wie folgt erklärt werden:

2) Thrombozyten haben neben ihrer hämostatischen auch eine pro-inflammatorische oder entzündungsmodulierende Funktion inne. Über GPIIb/IIIa rekrutieren die Thrombozyten weitere Leukozyten und nehmen damit über zusätzliche LEI auch Einfluss auf die leukozytäre Entzündungsreaktion nach zerebraler Ischämie.

Somit stärken die Ergebnisse dieser Arbeit, vor allem der zeitliche Verlauf der PEI und die zeitlich gestaffelten protektiven Eigenschaften des GPIIb/IIIa-Ak, folgende These: Die Interaktion intravaskulärer Leukozyten und Thrombozyten mit dem zerebrovaskulären Endothel tritt bereits vor Beginn des neuronalen Zelluntergangs in Kraft und könnte über bisher unbekannte transendotheliale Signale ausreichend für den Zelltod sein, ohne dass Leukozyten in das Parenchym einwandern müssen (Kataoka et al., 2005). Die Thrombozyten modulieren dabei indirekt diesen Signalweg, indem sie über GPIIb/IIIa zusätzliche Leukozyten rekrutieren und ihnen somit zu deutlich mehr Endothelinteraktionen verhelfen (siehe Abb. 23).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Wie bereits in der Einleitung geschildert, sind die Therapiemöglichkeiten des ischämischen Schlaganfalls äußerst begrenzt (Adams, Jr. et al., 2007). Auch neuroprotektive Maßnahmen zeigen sich in der Klinik als teilweise wenig Erfolg versprechend (Ginsberg, 2008a; Ginsberg, 2008b). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Thrombozyten nicht nur als rein hämostatisch wirksame Zellen in der Pathophysiologie des Schlaganfalls involviert sind, sondern auch möglicherweise immunmodulatorische Fähigkeiten besitzen. Durch seine zentrale Stellung bei der Interaktion von Thrombozyten sowohl mit dem Endothel, als auch mit Leukozyten, stellt GPIb α hier womöglich eine Option dar, unser Wissen über die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Thrombose und Entzündung nach zerebraler Ischämie weiter zu vertiefen. Außerdem konnten wir weitere Hinweise für die überarbeitete Vorstellung eventuell leukozytär ausgelöster transepithelialer Signalwege zur Induktion des neuronalen Zelltods finden: diese Signalwege benötigen dabei nicht die Transmigration von Leukozyten in das Parenchym. Eine definitive Klärung dieser These könnte durch gegen Mac-1 gerichtete Antikörper erbracht werden. In einer möglichen Versuchsreihe könnten PLEI in der IVM beobachtet und quantifiziert werden, ohne das Blutungs- und Komplikationsrisiko des GPIb α -Ak eingehen zu müssen.

Wie bereits zuvor beschrieben sollten die beobachteten ICH Anlass dazu geben, den Antikörper auf seine Risiken weiter zu untersuchen. Potenziell bestünde die Möglichkeit, mit einem GPIb α -Ak gleich zwei Ursachen des progressiven Zellunterganges entgegenzuwirken - der Thrombose zum Einen und der Neuroinflammation zum Anderen. Durch die festgestellten erheblichen Nebenwirkungen sollte man den verwendeten GPIb α -Ak zunächst vielmehr als wissenschaftliches Werkzeug sehen. Dieses kann uns zu weiteren Einblicken in die Pathophysiologie verhelfen und womöglich durch die Aufklärung des Signalweges zu einem pharmakologischen Angriffspunkt dieser Kaskade führen – bei gleichem protektiven Effekt, ohne dem Risiko von ICH.

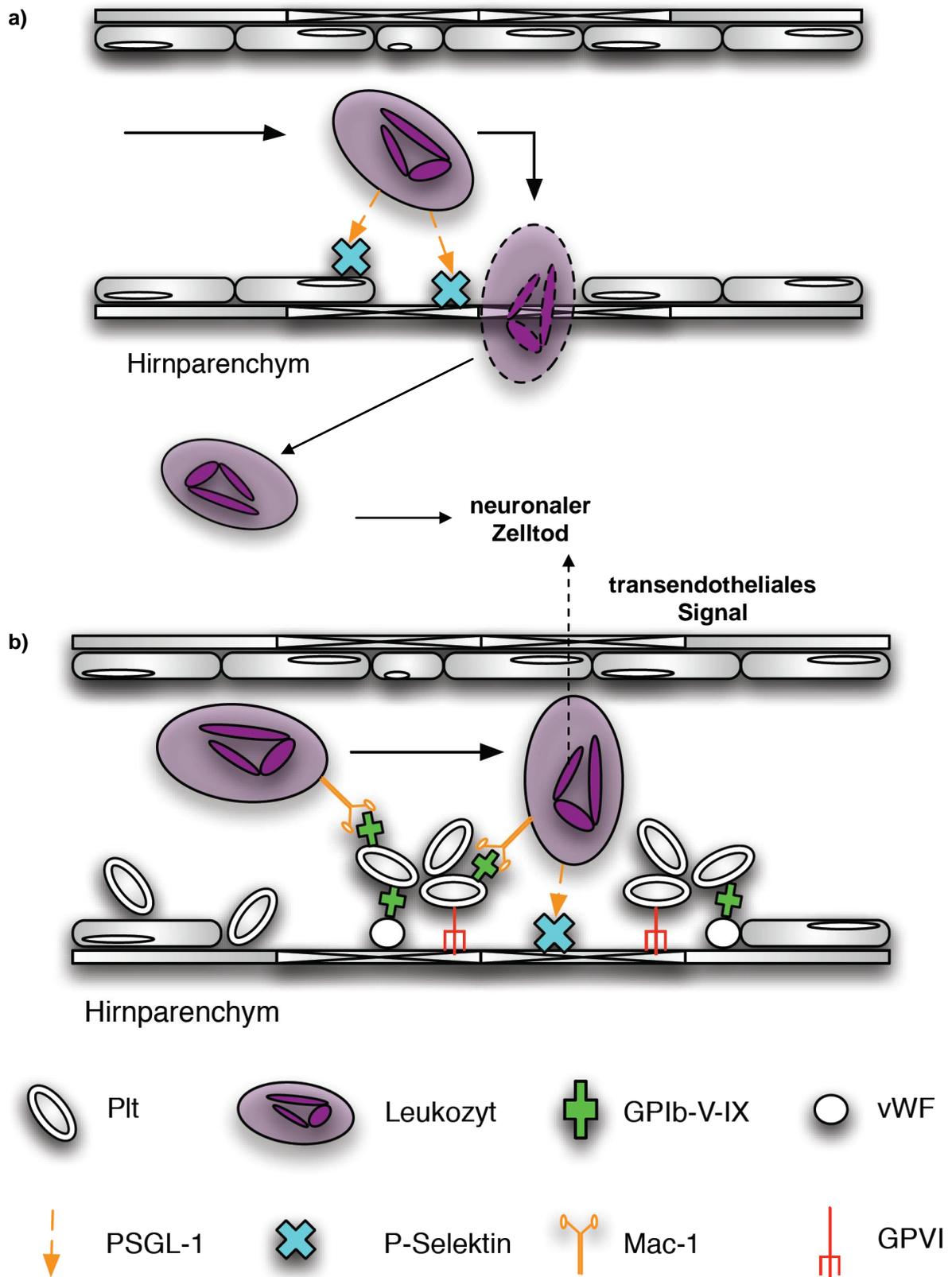


Abbildung 23: Thrombozyten-Leukozyten-Endothelinteraktionen a) zeigt LEI, die Transmigration von Leukozyten in das Parenchym und die Auslösung des neuronalen Zelltods. b) Es kommt zunächst zur PEI, deren Adhäsion und Aggregation. In einem nächsten Schritt werden Leukozyten rekrutiert und so LEI gefördert. Die Leukozyten lösen über bisher unbekannte transepitheliale Signalwege den neuronalen Zelltod aus – schon bevor Leukozyten vermehrt intraparenchymal zu finden sind.

Zusammenfassung

Zerebrovaskuläre Erkrankungen sind nach kardiovaskulären und malignen Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache in westlichen Industrieländern. In der Vergangenheit konnten viele neuroprotektive Methoden und Ansätze am Tiermodell beobachtet werden, allerdings schlug die Übertragung der Ergebnisse in die Klinik in den meisten Fällen fehl.

Für die Entstehung ischämischer Schlaganfälle spielen Thrombozyten (Plt) im Sinne einer thrombotischen Erkrankung eine zentrale Rolle. Durch die Verlegung eines hirnversorgenden Gefäßes fällt die zerebrale Durchblutung (CBF) ab, das betroffene Areal wird ischämisch (I) und stirbt ab. Auch nach einer Rekanalisierung und Reperfusion (R) des Gefäßes wird ein progredienter Zelluntergang beobachtet. Dies bezeichnet man als Reperfusionsschaden. In der Vergangenheit wurden neben vielen anderen Ursachen vor allem intraparenchymale Leukozyten für den neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie verantwortlich gemacht. Allerdings werden auch Thrombozyten seit kurzem als eine Art zweite pro-inflammatorische Zellreihe beschrieben. Dabei stellt thrombozytäres Glykoprotein (GP) Iba eine mögliche Schnittstelle zwischen thrombotischer und inflammatorischer Funktion dar. GPIba vermittelt die Interaktion von Thrombozyten mit subendotheliale von-Willebrand-Faktor (Kuijpers et al., 2004) einerseits und leukozytären Liganden, wie Mac-1 andererseits.

Die vorliegende Arbeit soll über deren Rolle am neuronalen Schaden nach experimenteller transients zerebraler Ischämie mittels intraluminale Okklusion der A. cerebri media (MCAO) tiefere Einblicke in die Pathophysiologie des neuronalen Zelltodes und Perspektiven für zukünftige Studien aufzeigen.

Vor allem im postkapillären Gefäßbett interagieren signifikant mehr Thrombozyten mit dem Endothel (PEI) – und dies nicht linear abhängig von der Reperusionszeit, sondern mit maximalen PEI rollender Thrombozyten 3 und 5 h nach Ischämie (3 h: $11,3 \pm 0,5$ Plt; 5 h: $13,0 \pm 0,7$ Plt vs. Kontrolle: $3,3 \pm 0,3$ Plt, $p < 0,05$). Fest am Endothel adhärierende Thrombozyten beobachteten wir hingegen um den Faktor 10 weniger häufig (3 h: $0,8 \pm 0,1$ Plt; 5 h: $1,3 \pm 0,2$ Plt vs. Kontrolle: $0,1 \pm 0,8$ Plt, $p < 0,05$). In arteriellen Gefäßen zeigte sich hingegen nur 3 h nach Ischämie eine kleine, aber signifikante Zunahme rollender Thrombozyten (3 h: $1,4 \pm 0,2$ Plt vs.

Kontrolle: $0,2 \pm 0,1$ Plt, $p < 0,05$). Der zeitliche Verlauf deckt sich auch mit Beobachtungen von Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI).

Mit GPIIb/IIIa-Antikörper behandelte Mäuse zeigten bereits 1h nach Injektion eine signifikante Zunahme der Blutungszeit von >10 Minuten (334 ± 8 s) und einen Rückgang der Thrombozyten von $>95\%$. Nach zerebraler I/R zeigten alle Depletionszeiten (R+0h, 1h, 3h, 5h, 7h) bessere funktionelle Ergebnisse in einem von uns modifiziertem Neuroscore, ähnlich dem Zeitverlauf der PEI und LEI jedoch vor allem 5 und 7h nach R (NSS vor MCAO: $1,9 \pm 0,2$; nach R+5h: $6,3 \pm 1,0$; R+7h: $3,3 \pm 0,3$ vs. Kontrolle $13,9 \pm 0,9$, $p < 0,05$). Entsprechend konnten wir zeigen, dass die Infarktvolumina zwar bei allen Tieren signifikant kleiner waren als bei der Kontrollgruppe, aber wieder zeigten die Tiere 5 und 7 h nach R die deutlichste Reduktion (R+5h $36,4 \pm 3,9$ mm³, R+7h $25,7 \pm 1,1$ mm³ vs. Kontrolle $49,3 \pm 1,7$ mm³, $p < 0,05$).

Dieser zeitabhängige zusätzliche protektive Effekt des Antikörper im Zeitfenster 5 ± 2 h nach I/R, deckt sich mit den Beobachtungen der PEI und LEI. Somit könnten Thrombozyten über GPIIb/IIIa zu Zeitpunkten maximaler Interaktion beider intravaskulärer Zellen mit dem zerebralen Endothel, zusätzliche Leukozyten rekrutieren, so deren LEI verstärken und damit die leukozytäre Immunantwort indirekt modulieren. Dies stützt Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass nicht intraparenchymale Leukozyten für den neuronalen Zelltod verantwortlich sein können, sondern ihre Interaktion mit dem Endothel für das Absterben der Neurone über bisher unbekannt transendotheliale Signale weit vor einer leukozytären Transmigration dafür verantwortlich ist.

Die Verbindung von Thrombozyten und akuter Entzündungsreaktion könnte neue und vielversprechende Ansätze für die Erforschung zukünftiger Therapiemöglichkeiten geben. Gerade GPIIb/IIIa scheint hier eine zentrale Rolle für die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten zu spielen. Sicherlich ist aber auch hinsichtlich des von uns verwendeten Antikörpers mehr präklinische Arbeit notwendig. Denn der durchaus überzeugende protektive Effekt wird durch die Beobachtung von intrazerebralen Blutungen in allen behandelten Tieren getrübt. Als Werkzeug zum besseren Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge des Reperfusionsschadens nach zerebraler Ischämie und den Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten in zukünftigen Studien, erscheint GPIIb/IIIa eine zentrale Rolle zu spielen.

Referenzen

- ABRAHAM,H., SOMOGYVARI-VIGH,A., MADERDRUT,J.L., VIGH,S., and ARIMURA,A. (2002). Filament size influences temperature changes and brain damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Exp. Brain Res.* **142**, 131-138.
- ADAMS,H.P., JR., DEL ZOPPO,G., ALBERTS,M.J., et al. (2007). Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/ American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* **38**, 1655-1711.
- AKOPOV,S., SERCOMBE,R., and SEYLAZ,J. (1996). Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* **8**, 11-94.
- ANDREWS,R.K. and BERNDT,M.C. (2004). Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.* **114**, 447-453.
- ANDREWS,R.K., GARDINER,E.E., SHEN,Y., and BERNDT,M.C. (2004). Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB. Life* **56**, 13-18.
- ANDREWS,R.K., GARDINER,E.E., SHEN,Y., WHISSTOCK,J.C., and BERNDT,M.C. (2003). Glycoprotein Ib-IX-V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1170-1174.
- BAUE,A.E. (1965). A STUDY OF SHOCK: ACIDOSIS AND THE DECLAMPING PHENOMENON. *Ann. Surg.* **161**, 41-45.
- BELAYEV,L., ALONSO,O.F., BUSTO,R., ZHAO,W., and GINSBERG,M.D. (1996). Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* **27**, 1616-1622.
- BERGMEIER,W., RACKEBRANDT,K., SCHRODER,W., ZIRNGIBL,H., and NIESWANDT,B. (2000). Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood* **95**, 886-893.
- BHATT,D.L. and TOPOL,E.J. (2003). Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 15-28.
- CAUWENBERGHS,N., MEIRING,M., VAUTERIN,S., et al. (2000). Antithrombotic effect of platelet glycoprotein Ib-blocking monoclonal antibody Fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1347-1353.
- CHA,J.K., JEONG,M.H., JANG,J.Y., et al. (2003). Serial measurement of surface expressions of CD63, P-selectin and CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. A possible role of CD40 ligand on platelets in atherosclerotic ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **16**, 376-382.
- CHOUDHRI,T.F., HOH,B.L., ZERWES,H.G., et al. (1998). Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J. Clin. Invest* **102**, 1301-1310.
- CIPOLLONE,F., CHIARELLI,F., DAVI,G., et al. (2005). Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia* **48**, 1216-1224.

- CLARK,R.K., LEE,E.V., FISH,C.J., et al. (1993). Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res. Bull.* **31**, 565-572.
- CONNOLLY,E.S., JR., WINFREE,C.J., SPRINGER,T.A., et al. (1996). Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J. Clin. Invest* **97**, 209-216.
- COOPER,D., CHITMAN,K.D., WILLIAMS,M.C., and GRANGER,D.N. (2003). Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **284**, G1027-G1033.
- DEL ZOPPO,G.J. (1998). The role of platelets in ischemic stroke. *Neurology* **51**, S9-14.
- DEL ZOPPO,G.J. and MABUCHI,T. (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 879-894.
- DEL ZOPPO,G.J., SCHMID-SCHONBEIN,G.W., MORI,E., COPELAND,B.R., and CHANG,C.M. (1991). Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* **22**, 1276-1283.
- DURUKAN,A., STRBIAN,D., and TATLISUMAK,T. (2008). Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr. Pharm. Des* **14**, 359-370.
- EMERICH,D.F., DEAN,R.L., III, and BARTUS,R.T. (2002). The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp. Neurol.* **173**, 168-181.
- ENGLER,R.L., SCHMID-SCHONBEIN,G.W., and PAVELEC,R.S. (1983). Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am. J. Pathol.* **111**, 98-111.
- FUKUDA,S. and WARNER,D.S. (2007). Cerebral protection. *Br. J. Anaesth.* **99**, 10-17.
- GARCIA,J.H., LIU,K.F., YOSHIDA,Y., LIAN,J., CHEN,S., and DEL ZOPPO,G.J. (1994). Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am. J. Pathol.* **144**, 188-199.
- GARCIA,J.H., WAGNER,S., LIU,K.F., and HU,X.J. (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26**, 627-634.
- GARLICH,C.D., JOHN,S., SCHMEISSER,A., et al. (2001). Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* **104**, 2395-2400.
- GARLICH,C.D., KOZINA,S., FATEH-MOGHADAM,S., et al. (2003). Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* **34**, 1412-1418.
- GAWAZ,M. (2004). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc. Res.* **61**, 498-511.
- GERRIETS,T., LI,F., SILVA,M.D., et al. (2003). The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Neurosci. Methods* **122**, 201-211.
- GINSBERG,M.D. (2008a). Current Status of Neuroprotection for Cerebral Ischemia. Synoptic Overview. *Stroke* .
- GINSBERG,M.D. (2008b). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **55**, 363-389.

- GOTO,S., TAMURA,N., HANDA,S., ARAI,M., KODAMA,K., and TAKAYAMA,H. (2002). Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* **106**, 266-272.
- GRAY,J.J., BICKLER,P.E., FAHLMAN,C.S., ZHAN,X., and SCHUYLER,J.A. (2005). Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology* **102**, 606-615.
- GROVER,N.B., NAAMAN,J., BEN-SASSON,S., and DOLJANSKI,F. (1972). Electrical sizing of particles in suspensions. 3. Rigid spheroids and red blood cells. *Biophys. J.* **12**, 1099-1117.
- GRUNER,S., PROSTREDNA,M., SCHULTE,V., et al. (2003). Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood* **102**, 4021-4027.
- HACKE,W., DONNAN,G., FIESCHI,C., et al. (2004). Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* **363**, 768-774.
- HALLENBECK,J.M., DUTKA,A.J., TANISHIMA,T., et al. (1986). Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* **17**, 246-253.
- HARA,H., HUANG,P.L., PANAHIAN,N., FISHMAN,M.C., and MOSKOWITZ,M.A. (1996). Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 605-611.
- HARTL,R., SCHURER,L., SCHMID-SCHONBEIN,G.W., and DEL ZOPPO,G.J. (1996). Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 1108-1119.
- HATA,R., MIES,G., WIESSNER,C., et al. (1998). A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **18**, 367-375.
- HAYWARD,N.J., ELLIOTT,P.J., SAWYER,S.D., BRONSON,R.T., and BARTUS,R.T. (1996). Lack of evidence for neutrophil participation during infarct formation following focal cerebral ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* **139**, 188-202.
- HEESCHEN,C., DIMMELER,S., HAMM,C.W., et al. (2003). Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1104-1111.
- HEIMANN,A., KROPPESTEDT,S., ULRICH,P., and KEMPSKI,O.S. (1994). Cerebral blood flow autoregulation during hypobaric hypotension assessed by laser Doppler scanning. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **14**, 1100-1105.
- HENN,V., SLUPSKY,J.R., GRAFE,M., et al. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591-594.
- IMS II STUDY (2007). The Interventional Management of Stroke (IMS) II Study. *Stroke* **38**, 2127-2135.
- Internet Stroke Center. Internet Stroke Center. Stroke Trials Registry. <http://www.strokecenter.org/trials/index.aspx>. 2007.
- ISHIKAWA,M., COOPER,D., ARUMUGAM,T.V., ZHANG,J.H., NANDA,A., and GRANGER,D.N. (2004). Platelet-leukocyte-endothelial cell interactions after middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 907-915.
- ISHIKAWA,M., COOPER,D., RUSSELL,J., et al. (2003). Molecular determinants of the prothrombotic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke* **34**, 1777-1782.

- ISHIKAWA,M., VOWINKEL,T., STOKES,K.Y., et al. (2005). CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* **111**, 1690-1696.
- KANEMITSU,H., NAKAGOMI,T., TAMURA,A., TSUCHIYA,T., KONO,G., and SANOK,K. (2002). Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **22**, 1196-1204.
- KATAOKA,H., KIM,S.W., and PLESNILA,N. (2004). Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 668-676.
- KATAOKA,H., KIM,SW., and PLESNILA,N. (2005). Adhesion of leukocytes to cerebral endothelium is sufficient to trigger delayed neuronal cell death following focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, S91.
- KAWAGUCHI,M., KIMBRO,J.R., DRUMMOND,J.C., COLE,D.J., KELLY,P.J., and PATEL,P.M. (2000). Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology* **92**, 1335-1342.
- KHANDOGA,A., BIBERTHALER,P., ENDERS,G., et al. (2002). Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* **74**, 681-688.
- KHATRI,P., WECHSLER,L.R., and BRODERICK,J.P. (2007). Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke* **38**, 431-440.
- KITAGAWA,K., MATSUMOTO,M., MABUCHI,T., et al. (1998). Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **18**, 1336-1345.
- KLEINSCHNITZ,C., POZGAJOVA,M., PHAM,M., BENDSZUS,M., NIESWANDT,B., and STOLL,G. (2007). Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* **115**, 2323-2330.
- KOCHANEK,P.M. and HALLENBECK,J.M. (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* **23**, 1367-1379.
- KOPP,C.W., STEINER,S., NASEL,C., et al. (2003). Abciximab reduces monocyte tissue factor in carotid angioplasty and stenting. *Stroke* **34**, 2560-2567.
- KROLL,M.H., HELLUMS,J.D., MCINTIRE,L.V., SCHAFER,A.I., and MOAKE,J.L. (1996). Platelets and shear stress. *Blood* **88**, 1525-1541.
- KUIJPERS,M.J., SCHULTE,V., OURY,C., et al. (2004). Facilitating roles of murine platelet glycoprotein Ib and alphaIIb beta3 in phosphatidylserine exposure during vWF-collagen-induced thrombus formation. *J. Physiol* **558**, 403-415.
- LI,G., SANDERS,J.M., BEVARD,M.H., et al. (2008). CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am. J Pathol.* **172**, 1141-1152.
- LOPEZ,J.A., ANDREWS,R.K., FSHAR-KHARGHAN,V., and BERNDT,M.C. (1998). Bernard-Soulier syndrome. *Blood* **91**, 4397-4418.
- LUTSEP,H.L. (2006). Thrombolytic and newer mechanical device treatment for acute ischemic stroke. *Expert. Rev. Neurother.* **6**, 1099-1105.
- LYDEN,P. *Thrombolytic Therapy for Acute Stroke*. Humana Press.

- MA, J., ZHAO, L., and NOWAK, T.S., JR. (2006). Selective, reversible occlusion of the middle cerebral artery in rats by an intraluminal approach. Optimized filament design and methodology. *J. Neurosci. Methods* **156**, 76-83.
- MACRAE, I.M. (1992). New Models of focal cerebral ischemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **34**, 302-308.
- MANEGOLD, P.C., HUTTER, J., PAHERNIK, S.A., MESSMER, K., and DELLIAN, M. (2003). Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* **101**, 1970-1976.
- MARLER, J.R., TILLEY, B.C., LU, M., et al. (2000). Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology* **55**, 1649-1655.
- MASSBERG, S., BRAND, K., GRUNER, S., et al. (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med.* **196**, 887-896.
- MASSBERG, S., ENDERS, G., LEIDERER, R., et al. (1998). Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* **92**, 507-515.
- MASSBERG, S., GAWAZ, M., GRUNER, S., et al. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J. Exp. Med.* **197**, 41-49.
- MASSBERG, S., SCHURZINGER, K., LORENZ, M., et al. (2005). Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprotection and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* **112**, 1180-1188.
- MAY, A.E., KALSCH, T., MASSBERG, S., HEROUY, Y., SCHMIDT, R., and GAWAZ, M. (2002). Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation* **106**, 2111-2117.
- MONACO, C., ANDREAKOS, E., YOUNG, S., FELDMANN, M., and PALEOLOG, E. (2002). T cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 659-668.
- NASU, I., YOKOO, N., TAKAOKA, S., et al. (2006). The dose-dependent effects of isoflurane on outcome from severe forebrain ischemia in the rat. *Anesth. Analg.* **103**, 413-8, table.
- NIESWANDT, B. and WATSON, S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* **102**, 449-461.
- NINDS (1995). The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1581-1587.
- NISHIJIMA, K., KIRYU, J., TSUJIKAWA, A., et al. (2001). In vivo evaluation of platelet-endothelial interactions after transient retinal ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2102-2109.
- O'COLLINS, V.E., MACLEOD, M.R., DONNAN, G.A., HORKY, L.L., VAN DER WORP, B.H., and HOWELLS, D.W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* **59**, 467-477.
- OMARI, K.M. and DOROVINI-ZIS, K. (2003). CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD4+ T cell adhesion to endothelium. *J. Neuroimmunol.* **134**, 166-178.
- PAN, J., KONSTAS, A.A., BATEMAN, B., ORTOLANO, G.A., and PILE-SPPELLMAN, J. (2007). Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* **49**, 93-102.
- PLESNILA, N. (2004). Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* **89**, 15-19.

PLESNILA,N., FRIEDRICH,D., ERISKAT,J., BAETHMANN,A., and STOFFEL,M. (2003). Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci. Lett.* **345**, 85-88.

PLESNILA,N., ZINKEL,S., LE,D.A., et al. (2001). BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 15318-15323.

POZZILLI,C., LENZI,G.L., ARGENTINO,C., et al. (1985). Imaging of leukocytic infiltration in human cerebral infarcts. *Stroke* **16**, 251-255.

ROMO,G.M., DONG,J.F., SCHADE,A.J., et al. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med.* **190**, 803-814.

ROSAMOND,W., FLEGAL,K., FURIE,K., et al. (2008). Heart Disease and Stroke Statistics--2008 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **117**, e25-146.

SALTER,J.W., KRIEGLSTEIN,C.F., ISSEKUTZ,A.C., and GRANGER,D.N. (2001). Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation. *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **281**, G1432-G1439.

SANGUIGNI,V., PIGNATELLI,P., LENTI,L., et al. (2005). Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* **111**, 412-419.

SCHMID-ELSAESSER,R., ZAUSINGER,S., HUNGERHUBER,E., BAETHMANN,A., and REULEN,H.J. (1998). A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* **29**, 2162-2170.

SELIM,M. (2008). Antiplatelets for Stroke Prevention. Implications of the PRoFESS Trial. *Stroke* .

SHAPIRA,Y., SHOHAMI,E., SIDI,A., SOFFER,D., FREEMAN,S., and COTEV,S. (1988). Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med.* **16**, 258-265.

SHIMAKURA,A., KAMANAKA,Y., IKEDA,Y., KONDO,K., SUZUKI,Y., and UMEMURA,K. (2000). Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* **858**, 55-60.

SILJANDER,P.R., MUNNIX,I.C., SMETHURST,P.A., et al. (2004). Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* **103**, 1333-1341.

SMITH,W.S. (2006). Safety of mechanical thrombectomy and intravenous tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. Results of the multi Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia (MERCi) trial, part I. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **27**, 1177-1182.

SMITH,W.S., SUNG,G., STARKMAN,S., et al. (2005). Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCi trial. *Stroke* **36**, 1432-1438.

STAHEL,P.F., SHOHAMI,E., YOUNIS,F.M., et al. (2000). Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **20**, 369-380.

STAIR (1999). Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke* **30**, 2752-2758.

STATLER,K.D., ALEXANDER,H., VAGNI,V., et al. (2006a). Comparison of seven anesthetic agents on outcome after experimental traumatic brain injury in adult, male rats. *J. Neurotrauma* **23**, 97-108.

- STATLER,K.D., ALEXANDER,H., VAGNI,V., et al. (2006b). Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury. *Brain Res.* **1076**, 216-224.
- STOLL,G., KLEINSCHNITZ,C., and NIESWANDT,B. (2008). Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* **112**, 3555-3562.
- TERAO,S., YILMAZ,G., STOKES,K.Y., ISHIKAWA,M., KAWASE,T., and GRANGER,D.N. (2008a). Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke* **39**, 943-950.
- TERAO,S., YILMAZ,G., STOKES,K.Y., et al. (2008b). Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke* **39**, 2560-2570.
- THAL,S.C., ENGELHARD,K., and WERNER,C. (2005). New cerebral protection strategies. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **18**, 490-495.
- THAL,S.C. and PLESNILA,N. (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods* **159**, 261-267.
- TONI,D., LORENZANO,S., SACCHETTI,M.L., FIORELLI,M., DE,M.M., and PRINCIPE,M. (2005). Specific therapies for ischaemic stroke: rTPA and others. *Neurol. Sci.* **26 Suppl 1**, S26-S28.
- TRABOLD,R., SCHUELER,O.G., ERISKAT,J., PLESNILA,N., BAETHMANN,A.J., and BACK,T. (2006). Arterial hypotension triggers perifocal depolarizations and aggravates secondary damage in focal brain injury. *Brain Res.* **1071**, 237-244.
- VAKILI,A., KATAOKA,H., and PLESNILA,N. (2005). Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **25**, 1012-1019.
- VETTO,R.M. and BRANT,B. (1968). Control of declamping shock. *Am. J. Surg.* **116**, 273-279.
- WEYRICH,A.S., LINDEMANN,S., and ZIMMERMAN,G.A. (2003). The evolving role of platelets in inflammation. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1897-1905.
- WEYRICH,A.S. and ZIMMERMAN,G.A. (2004). Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* **25**, 489-495.
- WHO MONICA PROJECT (1988). The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J. Clin. Epidemiol.* **41**, 105-114.
- WILLING,A.E. (2008). Experimental Models. Help or Hindrance. *Stroke* .
- WU,D., MEIRING,M., KOTZE,H.F., DECKMYN,H., and CAUWENBERGHS,N. (2002). Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 323-328.
- XIONG,J.P., STEHLE,T., GOODMAN,S.L., and ARNAOUT,M.A. (2003). New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**, 1155-1159.
- ZARBOCK,A., POLANOWSKA-GRABOWSKA,R.K., and LEY,K. (2007). Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* **21**, 99-111.
- ZAUSINGER,S., LUMENTA,D.B., PRUNEAU,D., SCHMID-ELSAESSER,R., PLESNILA,N., and BAETHMANN,A. (2003a). Therapeutical efficacy of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* **86**, 205-207.

ZAUSINGER,S., SCHOLLER,K., PLESNILA,N., and SCHMID-ELSAESSER,R. (2003b). Combination drug therapy and mild hypothermia after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **34**, 2246-2251.

ZHANG,R.L., CHOPP,M., CHEN,H., and GARCIA,J.H. (1994). Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Neurol. Sci.* **125**, 3-10.

ZHAO,P. and ZUO,Z. (2004). Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology* **101**, 695-703.

ZHAO,Q., MEMEZAWA,H., SMITH,M.L., and SIESJO,B.K. (1994). Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res.* **649**, 253-259.

ZHENG,S. and ZUO,Z. (2004). Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of P38 mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1172-1180.

ZIVIN,J.A. and GROTTA,J.C. (1990). Animal stroke models. They are relevant to human disease. *Stroke* **21**, 981-983.

ZWECKBERGER,K., STOFFEL,M., BAETHMANN,A., and PLESNILA,N. (2003). Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* **20**, 1307-1314.

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
A.	Arteria
AF	Atemfrequenz
Ak	Antikörper
AZV	Atemzugvolumen
BT	Blutungszeit
CBF	Zerebraler Blutfluss
CD	cluster of differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester
CI	Konfidenzintervall
CSF	zereberospinale Flüssigkeit
d	Tag
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HMV	Herzminutenvolumen
I	Ischämie
I/E	Verhältnis Inspiration/Expiration
ICH	intrazerebrale Hämorrhagie
ICP	intrakranieller Druck
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
i.v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
LD	Laser-Doppler-Fluxometrie
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck

MCA	Arteria cerebri media
MCAO	Okklusion der MCA
MRT	Magnetresonanztomographie
NINDS	National Institute for Neurological Disorders
N.	Nervus
NSS	Neurological Severity Score
n.t.	not treated (Kontrollgruppe in den GPIIb/IIIa-Ak Versuchen)
OR	Quotenverhältnis; <i>engl.</i> odds ratio
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	Perkutane koronare Intervention
Pa(X)	arterieller Partialdruck von X
PCO ₂	CO ₂ Partialdruck
PEI	Thrombozyten-Endothel-Interaktion
PLEI	Thrombozyten-Leukozyten-Endothel-Interaktion
Plt	Thrombozyt
PO ₂	O ₂ Partialdruck
R	Reperfusion
relCBF	relativer zerebraler Blutfluss
ROI	region of interest
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
STAIR	Stroke Therapy Academic Industry Roundtable
T	Temperatur
V.	Vena
vWF	von-Willebrand-Faktor

Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei meiner Familie, Verwandten und Freunden bedanken, ohne deren Geduld und Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit eine noch schwerere Aufgabe gewesen wäre.

Ohne die professionelle und finanzielle Unterstützung von Prof. Dr. Nikolaus Plesnila wäre die Arbeit, aber auch das Kennenlernen von Wissenschaft und Forschung in diesem Ausmaß sicher nicht möglich gewesen. Für seinen Rat, die Freiheit bei der Ausarbeitung, die er mir gab, und letztendlich seine Freundschaft bin ich sehr dankbar.

Für die großartige Teamarbeit, seine ständige Motivation und Unterstützung bin ich meinem guten Freund Sandro Krieg sicher mehr als nur ein Mittagessen schuldig.

Zweifelsohne kann man keine Arbeit ohne ein gutes Team leisten. Deswegen möchte ich mich bei meinen Kollegen für das angenehme und professionelle Klima bedanken: Stephanie Anetsberger, Prof. Dr. Alexander Baethmann, Dr. Doortje Engel, Sergej Feiler, Benjamin Friedrich, Philip Gass, Konstantin Hockel, Dr. Seong Woong Kim, Dr. James Meiring, Dr. Karsten Schöller, Susanne Schwarzmaier, Dr. Nicole Terpolilli, Elisabeth Török, Dr. Raimund Trabold and Florian Voigt.

Diese Studie wurde vom „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München im Rahmen eines Stipendiums gefördert. Für Vorsitz und Führung des Programms möchte ich deshalb Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danken.

Ganz besonders dankbar bin ich auch meiner Mutter und Veronica Marcos-Nickol für Geduld, konstruktive Kritik und nicht zuletzt auch für die Korrektur.

Lebenslauf

Name: Sebastian Malte Sonanini
Geburtstag: 04. Oktober 1981
Geburtsort: München, Deutschland
Nationalität: deutsch/schweizerisch

Ausbildung

Seit 01/09 Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Dr. med. R. Kopp, Klinikum Harlaching, München

11/08 Approbation

seit 10/05 Promotionsarbeit am Institut für Chirurgische Forschung und der Neurochirurgischen Klinik, Labor für Experimentelle Neurochirurgie, Prof. Dr. Nikolaus Plesnila, Ludwig-Maximilians-Universität, München

11/08 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Durchschnittsnote: 2,0)

10/04 – 11/08 Klinischer Abschnitt, Humanmedizin, Technische Universität München

09/04 Ärztliche Vorprüfung (Durchschnittsnote 3,0)

10/02 – 09/04 Vorklinik, Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München

09/92 – 06/01 Abitur: Leo-von-Klenze Gymnasium, München (Durchschnittsnote: 1,7)

Praktisches Jahr:

04/08 – 07/08 Gastroenterologie, II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, TU München
Univ.-Prof. Dr. med. Roland M. Schmid
Hämo-Onkologie, III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, TU München
Univ.-Prof. Dr. med. Christian Peschel

- 12/07 – 04/08 Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie, Rotkreuzkrankenhaus, München
 Prof. Dr. med. Michael H. Schoenberg
 Gefäßchirurgie, Rotkreuzkrankenhaus, München
 Dr. med. Christian Wack
- 08/07 – 12/07 Orthopädische Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
 Prof. Dr. med. Markus Kuster

Famulaturen

- 03/07 – 04/07 Allgemeinchirurgie Hospital de Clinicas, Universität von Buenos Aires, Argentinien
 Prof. Dr. P. A. Ferraina
- 09/06 – 10/06 Innere Medizin, Krankenhaus St. Georg, Bad Fredeburg
 Dr. med. E. Marcos
- 03/06 – 04/06 Pathologisches Institut der Technischen Universität München
 Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler
- 02/05 – 03/05 Praxis für Allgemeinmedizin, Dres. med. Blechschmidt – Hahn, Frasdorf

Nebentätigkeiten

- 10/08 Tutor im Kurs „Anamnese und körperliche Untersuchung“ für das 1. klinische Semester der Ludwig-Maximilians-Universität
- 01/08 Ultraschall (Abdomen und Retroperitoneum, Thorax, Schilddrüse)
 Grundkurs der bayerischen Landesärztekammer
- 10/07 erfolgreiche Teilnahme am erweiterten CPR-Kurs nach Richtlinien der SRC/AHA
- 08/07 – 12/07 Anatomie- und Präparationskurse orthopädischer Operationszugänge, Universität Zürich, Schweiz
- 10/02 – 09/04 Pflegedienstpraktikum und hilfspflegerische Tätigkeit in der Unfallchirurgie der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker, München

Wehrdienst

- 07/01 – 03/02 Wehrdienst bei den Gebirgsjägern, Berchtesgaden, Deutschland

Stipendium

04/06 Stipendiat des Promotionsstudiums „Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe)“, Ludwig- Maximilians-Universität, München

Weitere Fähigkeiten

Englisch: fließend in Sprache und Schrift

Spanisch: gute Kenntnisse

Französisch: Grundkenntnisse

Vorträge und Kongressbesuche

29.06.-03.07.09: „Platelet depletion with an anti-GPIIb-antibody improves the functional outcome after focal cerebral ischemia in mice“ (S.M. Sonanini, S.M. Krieg, N. Plesnila; 2009)

“Progression of platelet – endothelium interactions after acute stroke in mice” (S.M. Sonanini, S.M. Krieg, S.W. Kim, N. Plesnila; 2009) 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function, Chicago, USA

21. – 22.09.07: „Thrombozyten – Endothelinteraktion nach transientser fokaler zerebraler Ischämie“, 33. Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirnödeme und Hirndurchblutung“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Göttingen (S. Sonanini, S. Krieg, N. Plesnila; 2007)

20. – 24.05.07: „Loss of CO₂-reactivity in cerebral resistance vessels after subarachnoid hemorrhage in mice“ (B.P. Friedrich, S. Feiler, S. Sonanini, N. Plesnila; 2007) 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function, Osaka, Japan

11. – 13.05.07: „Thrombozyten – Endothelinteraktion nach transientser fokaler zerebraler Ischämie“ Abschlusskolloquium des Promotionsstudiums, Herrsching (S. Sonanini, S. Krieg, N. Plesnila; 2007)

13. – 14.10.06: 32. Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirnödeme und Hirndurchblutung“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Heidelberg

02.05.06

„Erhebung von Vitalparametern bei Kleintieren“

Kolloquium des Promotionsstudiengangs molekulare und systembiologische Medizin des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU München

München, Januar 2010