

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans



Therapeutische Depletion von Thrombozyten nach experimentellem Schlaganfall

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

vorgelegt von
Chi Dat Tran
aus Hannover
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter: PD Dr. med. Walter Rachinger

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Nicole Terpolilli
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2022

Für meine Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Definition	1
1.3 Pathophysiologie.....	2
1.4 Therapie	3
1.5 Thrombozyten in der Hämostase.....	4
1.6 Thrombozyten und Schlaganfall	5
1.7 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Allgemeine Maßnahmen	9
2.2 Versuchstiere	9
2.3 Analgesie und Narkose.....	9
2.4 Okklusion der A. cerebri media.....	10
2.5 Blutungszeit.....	11
2.6 Neuroscore.....	11
2.7 Histologie	13
2.8 Tuscheinjektion	14
2.9 Thrombozytendepletion	15
2.10 Versuchsgruppen.....	15
2.11 Statistische Auswertung.....	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Standardisierung.....	17
3.2 Tuscheinjektion	18
3.3 Therapeutische Depletion von Thrombozyten	23
4. Diskussion	33
4.1 Methoden	33
4.2 Ergebnisse	35
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis	39
7. Danksagung	44
8. Eidesstattliche Erklärung	45

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist weltweit und in der Europäischen Union die zweithäufigste Todesursache und einer der maßgeblichen Ursachen für Behinderungen im Erwachsenenalter. Jedes Jahr betrifft der Schlaganfall ca. 1,1 Millionen Einwohner der EU und ca. 440.000 Menschen sterben an der Erkrankung. Die Kosten, die mit Schlaganfall assoziiert sind, beliefen sich 2017 auf ca. 45 Milliarden Euro (Wafa, Wolfe et al., 2020).

In den USA beträgt die Inzidenz für neu aufgetretene und rezidivierende Schlaganfälle ca. 795.000 Menschen pro Jahr. Im Schnitt ist dort alle 40 Sekunden eine Person von einem Schlaganfall betroffen und die Mortalität lag 2017 bei 146.383 Menschen. Die direkten und indirekten Kosten von Schlaganfall in den USA beliefen sich von 2014 bis 2015 auf 45,5 Milliarden Euro (Virani, Alonso et al., 2020).

1.2 Definition

Die WHO definiert den Schlaganfall als eine sich „rasch entwickelnde fokale (oder globale) Störung der zerebralen Funktion, die länger als 24 Stunden anhält oder zum Tode führt und vaskulären Ursprungs ist“ (Aho, Harmsen et al., 1980).

Eine aktualisierte Definition beschreibt den Schlaganfall als eine akute Episode fokaler Dysfunktion des Gehirns, der Retina oder des Rückenmarks, die länger als 24 Stunden anhält oder beliebiger Dauer ist, sofern eine Bildgebung (CT oder MRT) oder eine Autopsie einen fokalen Infarkt oder eine Blutung bezüglich der Symptome aufzeigt (Sacco, Kasner et al., 2013, Hankey, 2017).

Der Schlaganfall kann im Grunde in zwei Formen unterschieden werden: den ischämischen Schlaganfall, der ca. 85% aller Schlaganfälle ausmacht, und den hämorrhagischen Schlaganfall, der für die übrigen 15% verantwortlich ist. Der hämorrhagische Schlaganfall wird noch unterteilt in die intrazerebrale Blutung und die Subarachnoidalblutung (Zerna, Hegedus et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit geht es um den ischämischen Schlaganfall.

1.3 Pathophysiologie

Das menschliche Gehirn macht ca. 2% des Körpergewichts aus, verbraucht aber ca. 20% der im Körper aus Glucose gewonnenen Energie (ca. 5,6 mg Glucose pro 100 g Hirngewebe pro Minute). Der Glukosemetabolismus stellt das für die physiologische Hirnfunktion notwendige ATP zur Verfügung, das für den neuronalen und nicht-neuronalen Zellerhalt sowie die Herstellung und Freisetzung von Neurotransmittern essenziell ist. (Mergenthaler, Lindauer et al., 2013). Die Blutzufuhr, über die die Glucose transportiert wird, beträgt im Ruhezustand 45 bis 60 ml pro 100 g Hirngewebe pro Minute (Harrington, Fragomeni et al., 2007).

Aufgrund seiner hohen metabolischen Aktivität ist das Gehirn besonders anfällig für ischämische Insulte (Moskowitz, Lo et al., 2010). Mit abnehmender Blutversorgung werden verschiedene metabolische und biologische Funktionen supprimiert. Bei einem Schwellenwert von ca. 15% vom Ausgangswert der Blutversorgung versagt die Energieversorgung und die Zellmembran depolarisiert. Die zentrale Region des ischämischen Areals, in dem die Durchblutung unterhalb des Schwellenwerts für eine terminale Depolarisation sinkt, wird Infarktkern genannt. Die peripheren Regionen, in denen elektrische und metabolische Funktionen, nicht aber der Energiemetabolismus und die Membranpolarisation beeinträchtigt sind, heißen Penumbra (Hossmann, 2012). Die Penumbra bezeichnet demnach ein Gewebe, das funktionell eingeschränkt aber strukturell (noch) nicht geschädigt ist und daher prinzipiell noch zu retten ist. Mit der Zeit breitet sich der Infarktkern in die Penumbra aus und therapeutische Möglichkeiten gehen dabei verloren (Abb. 1). Dabei spielen komplexe Kaskaden der Exzitotoxizität, des oxidativen Stresses, des programmierten Zelltods und der Entzündung eine Rolle. Die Identifikation der Penumbra hilft dabei, Patientengruppen zu erfassen, die von einer Wiederherstellung der Blutversorgung profitieren könnten (Moskowitz, Lo et al., 2010).

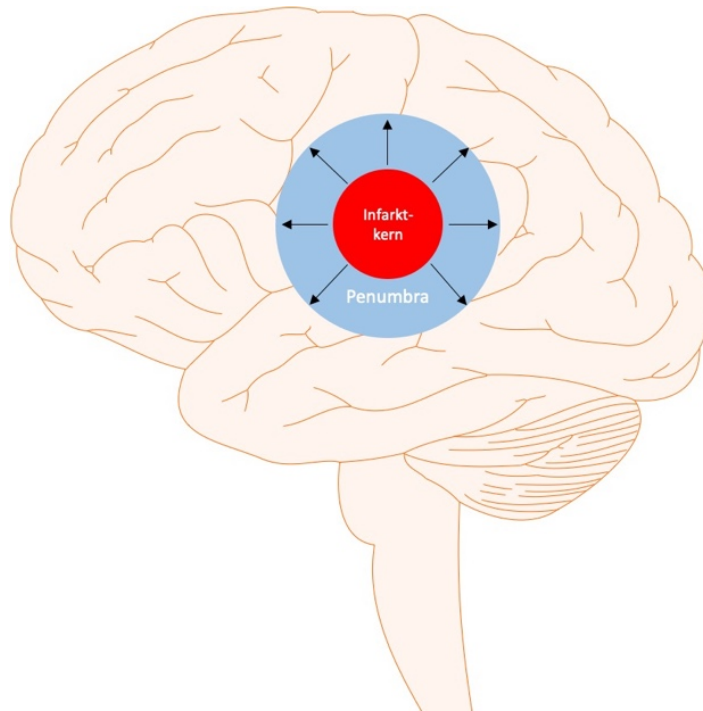


Abb. 1: Schema eines ischämischen Schlaganfalls mit ausbreitendem Infarktkern (rot) und noch zu rettender Penumbra (blau)

Paradoxerweise sind die Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung und die Reoxygenierung häufig mit einer Verschlimmerung des Gewebeschadens und einer umfassenden entzündlichen Reaktion - auch „Reperfusionsschaden“ genannt - assoziiert. Die Reoxygenierung des Hirngewebes leitet komplexe pathophysiologische Kaskaden ein, die die Thrombosebildung sowie die Rekrutierung von Entzündungszellen fördern (Denorme and De Meyer, 2016). Außerdem kann es sein, dass trotz erfolgreicher Wiedereröffnung der großen hirnversorgenden Gefäße die Mikrozirkulation des Gehirns nicht wieder perfundiert wird (No-reflow Phänomen) (Eltzschig and Eckle, 2011). Diese Mechanismen sind sehr wahrscheinlich daran beteiligt, dass die aktuell verwendeten Therapieoptionen des ischämischen Schlaganfalls nicht ihr volles Potential entfalten können.

1.4 Therapie

Das Ziel der Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls ist die Rekanalisierung der okkludierten Arterie, um die zerebrale Perfusion wiederherzustellen. Verfügbare Rekanalisationsstrategien sind die intravenöse Thrombolyse und die endovaskuläre Thrombektomie (Catanese, Tarsia et al., 2017).

Patienten, die innerhalb von 4,5 Stunden nach Symptombeginn ins Krankenhaus kommen, sollten mit intravenösem tPA (0,9 mg/kg Körpergewicht, maximal 90 mg, 10% der Gesamtdosis als Bolus, den Rest als 60 minütige Infusion) behandelt werden, sofern keine Kontraindikationen bestehen und eine entsprechende intra- und post-Thrombolyse Behandlung möglich ist. Kontraindikationen wären z.B. akute Blutungen, erhebliches Schädel-Hirn-Trauma, Einnahme von Antikoagulation, kürzlich erlittener ischämischer Schlaganfall oder vorherige intrakranielle Blutungen (Meschia and Brott, 2018).

Das enge therapeutische Zeitfenster und die schwache Wirksamkeit bei der Rekanalisierung großer Hirngefäße hat eine breite Anwendung der tPA-Lyse allerdings verhindert. So werden selbst in spezialisierten Zentren selten mehr als 10% der Schlaganfallpatienten der Lysetherapie zugeführt (Silva and Nogueira, 2020).

Für die Rekanalisierung großer Hirngefäße steht seit einigen Jahren die mechanische Thrombektomie zur Verfügung. Diese Therapie mittels Stent Retrievern sollte innerhalb von 6 Stunden nach Symptombeginn durchgeführt werden (Meschia and Brott, 2018). Der Retriever wird dabei über eine Schleuse in der Leiste in das verschlossene zerebrale Gefäß vorgeschoben und der Verschluss per Ummantelung mit einem Drahtgeflecht oder durch Absaugung entfernt. Mit dieser Technik können selbst Verschlüsse der intrakraniellen A. carotis interna und des ersten Segments der A. cerebri media erfolgreich behandelt werden (Powers, 2020).

1.5 Thrombozyten in der Hämostase

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der Hämostase (Clemetson, 2012). In der primären Hämostase adhären Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand durch unterschiedliche an der Thrombozytenoberfläche exprimierte Glykoproteine (Abb. 2). Unter hohen Scherbedingungen bindet im Plasma zirkulierender von-Willebrand-Faktor an das exponierte subendotheliale Kollagen der geschädigten Gefäßwand. Der entfaltete von-Willebrand-Faktor bietet mehrere Bindungsstellen für den Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa der Thrombozyten. Dieser Prozess verlangsamt die Plättchen und erlaubt eine festere Bindung des GPIIb/IIIa-Rezeptors an das Kollagen. Dadurch werden die Thrombozyten aktiviert und verändern ihre Form. Es folgen die Rekrutierung weiterer Plättchen, deren Aktivierung und die Aggregation der Plättchen

untereinander. All dies wird u.a. durch die Freisetzung von Thromboxan A₂ und ADP aus den Thrombozytengranula vermittelt. Die Thrombusbildung entsteht über den Plättchen Fibrinogen Rezeptor GPIIb/IIIa (Koupenova, Clancy et al., 2018). Bei der Aktivierung der Thrombozyten wird auch anorganisches Polyphosphat (PolyP) freigesetzt, welches den Koagulationsfaktor FXII aktiviert und damit die intrinsische Koagulationskaskade und das Kallikrein-Kinin-System (KKS) mit Bildung von proinflammatorischen Bradykinin in Gang setzt (Burkard, Vogtle et al., 2020). Der GPIb-Rezeptor fungiert außerdem als Verknüpfungsstelle von Thrombose und Entzündungsreaktion. Bezüglich der Entzündungskaskade beinhaltet der GPIb-Rezeptor eine Bindungsstelle für das Integrin Mac-1, der von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird. Daher ist der GPIb-Rezeptor auch an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt (Schuhmann, Guthmann et al., 2017).

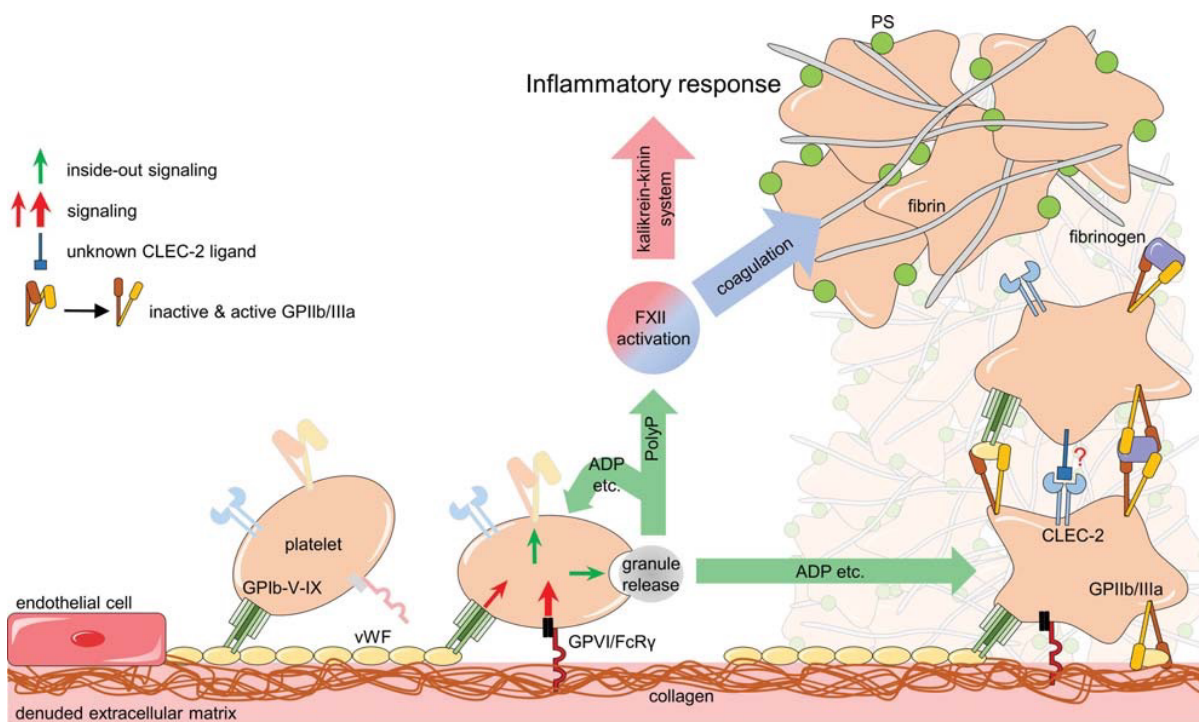


Abb. 2: Modell der Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der geschädigten Gefäßwand mit nachfolgender Thrombusbildung (aus Burkard, Vogtle et al., 2020)

1.6 Thrombozyten und Schlaganfall

In verschiedenen Tiermodellen des ischämischen Schlaganfalls konnte gezeigt werden, dass sich ¹¹¹Indium-markierte Thrombozyten in der ipsilateralen Hemisphäre des ischämischen Schadens ansammeln (Obrenovitch and Hallenbeck, 1985,

Kochanek, Dutka et al., 1988, Jafar, Menoni et al., 1989, Dietrich, Dewanjee et al., 1993).

Außerdem sind Marker der Thrombozyten-Aktivität, nämlich Plättchen Faktor 4 und β -Thromboglobulin, die bei Plättchenaktivierung aus der α -Granula freigesetzt werden, im Plasma von Schlaganfallpatienten erhöht (del Zoppo, 1998). Hemmte man die Thrombozytenaggregation durch einen GPIIb/IIIa-Inhibitor (GPI 562) im Schlaganfall-Mausmodell vor der Okklusion der A. cerebri media oder auch danach, so fand man eine geringere Akkumulation von Thrombozyten in der ipsilateralen ischämischen Hemisphäre und ein geringeres Infarktvolumen (Choudhri, Hoh et al., 1998). Diese Daten deuten darauf hin, dass mikrovaskuläre Thrombosen distal der arteriellen Gefäßokklusion entstehen und so zum ischämischen Hirnschaden beitragen (Choudhri, Hoh et al., 1998).

In den folgenden Jahren konnte durch weitere Experimente gezeigt werden, wie durch Blockierung von verschiedenen Rezeptoren der Thrombozyten, die Folgen des Schlaganfalls beeinflusst werden (Abb. 3). So führte in einem Schlaganfall-Mausmodell eine Blockade des GPIb-Rezeptors durch Fab-Fragmente eines Antikörpers (p0p/B) oder GPIb Antagonisten Antifibatide zu einem verringerten Infarktvolumen und einem verbessertem neurologischen Ergebnis nach MCAo (Kleinschnitz, Pozgajova et al., 2007, Li, Fan et al., 2015). Die Depletion des GPVI-Rezeptors (JAQ1 Antikörper) führte zu einem ähnlichem, jedoch weniger starken Effekt und die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch F(ab)₂-Fragmente (JON/A) hatte keinen Einfluss auf das Infarktvolumen und erhöhte sogar das Risiko von intrazerebralen Blutungen (Kleinschnitz, Pozgajova et al., 2007). Die Blockade des GPIb-Rezeptors führte in einer weiteren Studie zu einer verbesserten zerebralen Perfusion nach Rekanalisierung nach MCAo (Pham, Helluy et al., 2011). Und in transgenen Mäusen, bei denen die extrazelluläre Domäne des GPIb-Rezeptors durch eine alpha-Untereinheit des IL-4 Rezeptors ersetzt wurde, zeigte sich auch ein verringertes Infarktvolumen und ein besseres funktionales Ergebnis nach MCAo (De Meyer, Schwarz et al., 2011). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei vWF-defizienten Mäusen beobachtet werden (Kleinschnitz, De Meyer et al., 2009). In erwachsenen und komorbiden (atherosklerotischen, diabetischen und hypertensiven) Mäusen erwies sich die Blockade der verschiedenen Rezeptoren der Thrombozyten ebenfalls als protektiv gegenüber dem akuten ischämischen Schlaganfall (Kraft, Schuhmann et al.,

2015). Zudem konnte die Begrenzung der Infarktzunahme auch bei zusätzlicher Verabreichung von tPA beobachtet werden und dies geschah ohne zusätzliche Blutungskomplikationen (Schuhmann, Kraft et al., 2018). Thrombin-Rezeptor-defiziente Mäuse (Par-4^{-/-}) sowie Mäuse, dessen ADP-Rezeptoren mit Ticagrelor blockiert wurden, hatten ebenso verringerte Infarktvolumina und ein verbessertes neurologisches Ergebnis nach MCAo (Mao, Zhang et al., 2010, Yamauchi, Imai et al., 2017). Außerdem wirkt auch ein Defekt in der α -Granulat oder δ -Granulat Sekretion protektiv gegenüber dem ischämischen Schlaganfall (Deppermann, Cherpokova et al., 2013, Stegner, Deppermann et al., 2013). Ein Fehlen beider Sekretionsformen führte jedoch zu intrazerebralen Blutungen (Deppermann, Kraft et al., 2017). Interessanterweise führte nicht nur die Blockade von Thrombozyten-Rezeptoren zu einer Verbesserung nach ischämischen Schlaganfall, sondern auch die > 90%-ige Depletion der Thrombozyten aus der Blutzirkulation (Morowski, Vogtle et al., 2013).

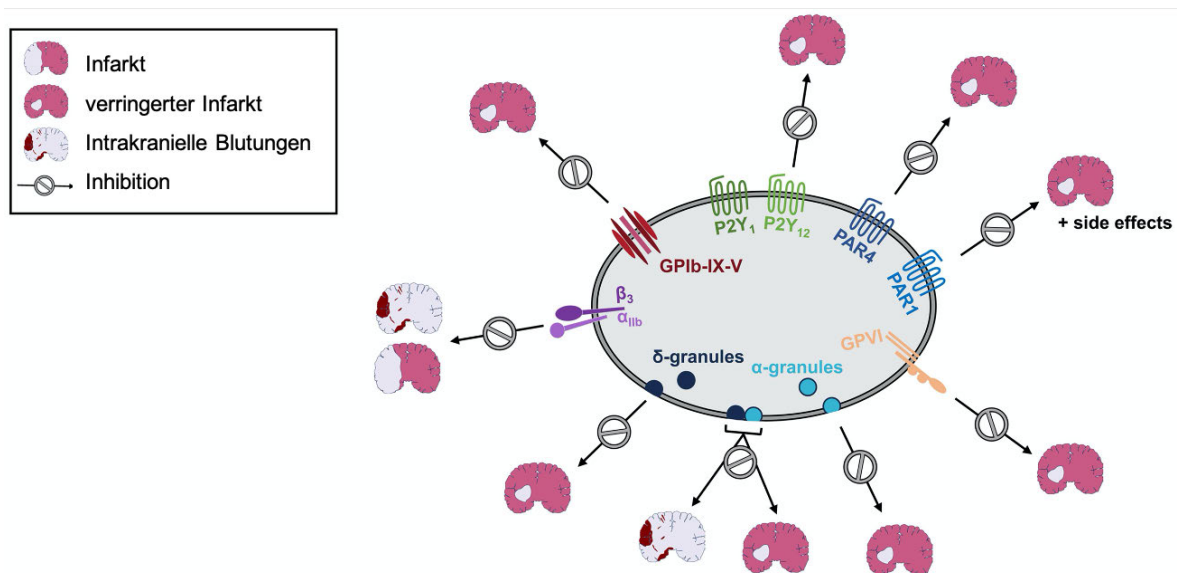


Abb. 3: Blockierung verschiedener Rezeptoren und Degranulation der Thrombozyten und ihre Auswirkungen auf das Infarktvolumen.

Inhibierung der Thrombozytenaktivierung oder der Degranulation führen zu einem verringerten Infarktvolumen in experimentellen Schlaganfallmodellen, nicht jedoch die GPIIb/IIIa-Blockade. Die Blockade oder ein genetischer Defekt von GPIb, GPVI, P2Y₁, P2Y₁₂, PAR1 oder PAR4 führen zu einem verringerten Infarktvolumen nach Reperfusion. Mangel an δ -Granulat oder α -Granulat Sekretion verbessern das Ergebnis nach experimentellem Schlaganfall. Der gleichzeitige Mangel von δ -Granulat und α -Granulat oder die GPIIb/IIIa-Blockade verursacht intrakranielle Blutungen. (übersetzt aus Stegner, Klaus et al., 2019)

Nicht nur die mikrovaskuläre Thrombusbildung scheint eine Rolle bei der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls zu spielen, sondern auch inflammatorische Prozesse, an denen Thrombozyten beteiligt sind, sind bedeutsam (Stoll, Kleinschnitz et al., 2010). So konnten verschiedene Forschungsgruppen zeigen, dass Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, T-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen sich im ischämischen Gehirn in experimentellen Schlaganfallmodellen ansammeln (Schroeter, Jander et al., 1994, Stoll, Jander et al., 1998, Gelderblom, Leyboldt et al., 2009). Die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors bewirkte neben einer Verringerung des Infarkt Volumens auch eine Abnahme von aktivierten Makrophagen, Monozyten und T-Zellen und eine verringerte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 β und TNF- α (Schuhmann, Guthmann et al., 2017). Der ischämische Schlaganfall wird von manchen Autoren daher auch als eine thrombo-inflammatorische Erkrankung betrachtet (Stegner, Klaus et al., 2019).

In den Studien zur Blockade des GPIIb/IIIa- und GPIIb/IIIa-Rezeptors wurden die Antikörper eine Stunde vor oder nach MCAo (GPIIb-Antikörper) bzw. 5 Tage vorher gegeben (GPIIb-Antikörper) (Kleinschnitz, Pozgajova et al., 2007, Kraft, Schuhmann et al., 2015, Schuhmann, Guthmann et al., 2017). In dem Experiment zur Depletion der Thrombozyten erfolgte die Antikörpergabe 12 Stunden vor MCAo (Morowski, Vogtle et al., 2013). Daher blieb bisher das therapeutische Fenster der Thrombozytenhemmung unklar. Führt möglicherweise auch eine Depletion nach 1, 3, 5, 7 und 12 Stunden zu einem protektiven Effekt?

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass Thrombozyten nicht nur akut, sondern auch verzögert zum postischämischen Hirnschaden beitragen können. Der postischämische Hirnschaden müsste sich demnach auch durch eine verzögerte Depletion von Thrombozyten verringern lassen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu untersuchen, wie groß das therapeutische Zeitfenster der Depletion der Thrombozyten nach experimentellem Schlaganfall ist.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Maßnahmen

Alle Experimente wurden von August 2018 bis April 2020 am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung der Universität München ausgeführt.

Die Versuche wurden verblindet durchgeführt und die Tiere randomisiert den Gruppen zugeordnet. Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien der LMU München und der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag 02-17-041).

2.2 Versuchstiere

Es wurden männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 18 bis 22 g für die Versuche verwendet. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und unterlagen einem physiologischen Tag-Nacht-Zyklus.

2.3 Analgesie und Narkose

Zur Analgesie wurde den Tieren 0,1 mg/kg Buprenorphin (Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande) subkutan 30 Minuten vor der OP injiziert. Anschließend wurde die Narkose in einer Kammer mit 4% Isofluran (Piramal Critical Care B.V., Voorschoten, Niederlande) in Luft (1 l/min) für 60 bis 90 Sekunden induziert. Die Inhalationsnarkose wurde mit 2% Isofluran, 30% Sauerstoff und 70% Stickstoffdioxid über eine Gesichtsmaske aufrechterhalten (Panahpour, Terpolilli et al., 2019). Nach der OP erhielten die Tiere zur weiteren Analgesie 100 µl Carprofen (4 mg/kg) (Zoetis, Berlin, Deutschland) und aufgrund der Dehydratation 1 ml NaCl subkutan. Am Morgen nach der Operation erhielten die Mäuse wieder 1 ml NaCl subkutan und 100 µl Carprofen. Die Körpertemperatur wurde während der OP über eine Heizmatte (FHC, Bowdoin, USA) und eine rektale Sonde kontinuierlich auf 37°C gehalten. Im Anschluss an die OP wurden die Tiere für 2 Stunden in einem 32°C warmen Inkubator (Peco Services Ltd, Cumbria, Großbritannien) gelegt. Zur Analgesie und Anästhesie für die Versuche der Blutungszeit und der Tuscheinjektion wurde eine 3-fach Kombi aus 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Zoetis, Berlin, Deutschland), 5 mg/kg KG Midazolam (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande) verwendet, die intraperitoneal injiziert wurde (Thal and Plesnila, 2007).

2.4 Okklusion der A. cerebri media

Das intraluminale MCAo (engl. Middle Cerebral Artery occlusion) Modell wurde 1986 von Koizumi entwickelt, um die Pathologie des ischämischen Schlaganfalls in der Ratte zu simulieren. Eine Modifizierung des Modells erfolgte später durch Longa (Ansari, Azari et al., 2011).

Zur Messung der zerebralen Durchblutung wurde eine Laser-Doppler-Fluxometrieinheit (Perimed, Järfälla, Schweden) verwendet. Zunächst wurden die Tiere nach Induktion der Narkose in Bauchlage fixiert und Bepanthen Augensalbe (KVP Pharma + Veterinär Produkte, Kiel, Deutschland) wurde zum Schutz vor Trockenheit auf die Augen appliziert. Es wurde ein Hautschnitt auf der linken Kopfseite zwischen Auge und Ohr gesetzt und der Schädel exponiert. Der Ansatz des M. temporalis wurde vom Schädel mit einem scharfen Skalpel abgelöst und durch sorgfältiges Abtrennen des Muskels eine Tasche zwischen Muskel und Knochen geformt. Anschließend wurde eine Glasfasersonde (Perimed, Järfälla, Schweden) am Parietalknochen über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media in die Tasche platziert und mit einem Zwei-Komponentenkleber (Drechseln und Mehr, Weiden, Deutschland) fixiert (Plesnila, Zinkel et al., 2001)

Die Tiere wurden danach in Rückenlage positioniert und mittels Klebestreifen fixiert. Es wurde ein medianer Hautschnitt zwischen Sternum und Unterkieferknochen durchgeführt und das Fett und die Unterkieferspeicheldrüsen mittels Retraktor nach lateral geschoben. Die linke A. carotis communis (ACC), A. carotis externa (ACE) und A. carotis interna (ACI) wurden unter vorsichtiger Präparation und Schonung des N. vagus und der infrahyalen Muskulatur freigelegt und isoliert. Mit einem 5-0 Seidenfaden (Pearsalls, Taunton, UK) wurde die ACC möglichst distal der Bifurkation ligiert. Ebenso wurde die ACE mit einem Faden unterbunden. Ein lockerer Knoten wurde danach um die ACC geschlungen und ein Mikroclip (FST, Heidelberg, Deutschland) an der ACI befestigt. Zwischen der Ligatur der ACC und dem lockereren Knoten wurde mittels Mikroschere eine Inzision durchgeführt und darüber der Okklusionsfaden (Docol Corporation, Sharon, USA) eingeführt. Der Gefäßclip der ACI wurde entfernt, der Okklusionsfaden in die ACI vorgeschoben und der locker umschlungene Faden der ACC leicht zugezogen. Der Okklusionsfaden wurde anschließend bis zum Abgang der A. cerebri media fortgeführt (Abb. 4) und eine korrekte Lage konnte mittels Laser-Doppler-Sonde bestimmt werden, d.h. Abfall der

regionalen zerebralen Durchblutung (engl. rCBF) auf 20% des Ausgangswertes. Nach Fixierung des Okklusionsfadens durch festes Zuziehen des die ACC umschlingenden Fadens wurde der operierte Bereich mit NaCl gespült und mit einem Wattestäbchen abgetrocknet. Die Hautinzision wurde mit 2 bis 3 Einzelknopfnähten verschlossen und die Tiere in den auf 32°C beheizten Inkubator (s.o.) gebracht. Die gesamte OP-Zeit betrug im Durchschnitt ca. 25 Minuten. 55 Minuten nach MCAo wurde die Wunde am Hals wieder geöffnet. Die ACC wurde freipräpariert, der Okklusionsfaden entfernt und die ACC mit dem vorgelegten Faden fest verschlossen. Die Wunde wurde erneut mit Einzelknopfnähten versorgt und die Tiere in den Inkubator gelegt. Nach 1 Stunde konnten sie wieder in ihre Käfige zurück verlegt werden (Kataoka, Kim et al., 2004)

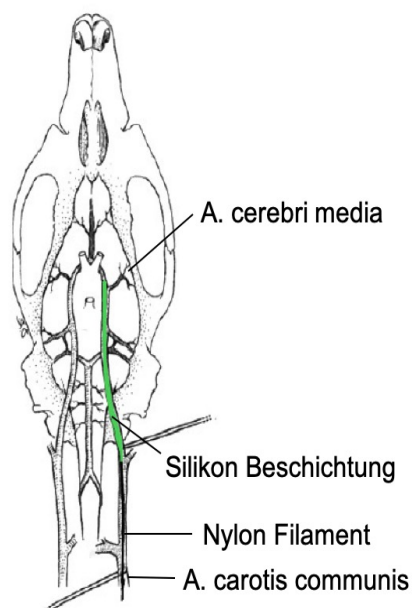


Abb. 4: Positionierung des Okklusionsfadens

2.5 Blutungszeit

Die Körpertemperatur wurde während des Versuchs über eine Heizmatte auf 37°C gehalten. Die Blutungszeit wurde bestimmt indem 3 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell amputiert wurden. Anschließend wurde das Schwanzende in 37°C warmes Wasser gehalten und die Zeit gemessen, bis die Blutung aufhörte. Ab 4 Minuten wurde von einer verlängerten Blutungszeit ausgegangen.

2.6 Neuroscore

Ein Tag nach der OP wurde für die neurologische Beurteilung der Tiere ein Score Sheet verwendet. Es beinhaltete folgende Elemente:

Datum/Tier	
Körpergewicht	
Punkte im Verhältnis zum Vortag: zugenommen (0) abgenommen um <5% (1) abgenommen um 5-10% (5) abgenommen um >10% (20)	
Bewusstseinslage wach und agil (0) vermindertes Bewusstsein: schläfrig, verminderte Aktivität, verminderte Fluchtreaktion (5) komatös (20)	
Verhalten normal: schlafend, neugierig, soziale Interaktionen (0) geringe Änderung im normalen Verhalten: verminderte soziale Interaktionen/Neugierde (1) untypisches Verhalten: hyperkinetisch (10) Zeichen von Schmerzen, Autoaggression, Isolation, Lethargie, schwerer Hyperkinetismus und Stereotypie, Verlust von Stellreflexen (20)	
Allgemeiner Zustand Fell glatt, Körperöffnungen sauber, Augen rein/glänzend (0) Defekt im Fell: veränderte Fellpflege (1) Fell matt, Körperöffnungen unsauber, untypische Körperhaltung, höherer Muskeltonus (10) Augen matt, Muskeln verkrampft/gelähmt, Atemgeräusche, Tier ist kalt (20)	
Klinischer Zustand normal: Temperatur normal, regelmäßige Atmung, Puls normal, Schleimhäute rosa, Extremitäten warm (0) geringe Veränderung vom normalen Zustand (1) Temperaturveränderung 1-2°C, Puls +30%, schwere Atmung, piepsende Atemgeräusche (5) Temperaturveränderung >2°C, Puls +/-50%, Dyspnoe, Schnappatmung, Atemgeräusche (20)	
Wunde reizlose Wunde (0) leicht entzündete Wunde (5) nicht heilende/entzündete Wunde (20)	
Neurologischer Zustand Modell assoziierte Defekte: leichte kontralaterale Lähmung, Lähmung der kontralateralen Vorderpfote, Beeinträchtigung in der Empfindlichkeit und Koordination (2) Leichte neurologische Defekte z.B. Anfälle (5) Schwere neurologische Defekte z.B. Status epilepticus (20)	
Summe 0 keine Belastung 1-9 geringe Belastung: es muss mit Vorsicht weiter beobachtet werden 10-19 moderate Belastung: der Tierarzt ist zu kontaktieren, das Tier muss zweimal täglich untersucht werden, sollte sich der Zustand nicht innerhalb von 24 Stunden bessern, muss das Tier getötet werden >20 schwere Belastung: das Tier muss getötet werden	
Humane Endpunkte: Das Tier ist sofort zu töten Bei Verlust von Körpergewicht >10% im Verhältnis zum Gewicht vor Behandlungsbeginn an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, wenn sich das Tier kalt anfühlt, wenn Beine/Abdomen blau sind, bei zu hoher Körpertemperatur (>39°C), Abszess, Zeichen von Schmerzen trotz schmerzlindernder Behandlung (bewegungslos, gestäubtes Fell, Augen geschlossen, Kyphose), bei Paralyse, die die Fütterung behindert, bei matten Augen, bei Selbstverstümmelung	

Tab. 1: Score Sheet zur Erfassung der neurologischen Funktion

Zusätzlich wurde ein modifizierter Bederson (0 bis 4) Score 1 und 24 Stunden nach MCAo verwendet (Bederson, Pitts et al., 1986, Meisel, Prass et al., 2004):

0	Keine beobachtbaren Defizite
1	Flexion der Vordergliedmaße
2	Flexion der Vordergliedmaße und kreisende Bewegung
3	Flexion der Vordergliedmaße, kreisende Bewegung und verminderter Widerstand gegenüber lateralem Anstoß
4	Tod

Tab. 2: Modifizierter Bederson Score

2.7 Histologie

Am Tag nach der OP und nach der neurologischen Untersuchung sowie der Bestimmung der Blutungszeit wurden die Tiere per Genickbruch getötet. Das Gehirn wurde entnommen und mit Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -18°C. Um Gefrierschnitte anzufertigen, wurden die Gehirne mit einem wasserlöslichen Einbettmedium (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) ummantelt und in einem Kryostaten (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten (Abb. 5). Der Abstand zwischen den einzelnen Hirnschnitten betrug 750 µm und es wurden insgesamt 12 Schnitte pro Hirn auf einem Objektträger gesammelt. Die Färbung erfolgte nach Nissl (MORPHISTO GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Die Gefrierschnitte wurden bei 10-facher Vergrößerung digitalisiert (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und anschließend histomorphometrisch (Axiovision, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) hinsichtlich Infarkt volumen, Hemisphärenschwellung und Blutungen ausgewertet (Panahpour, Terpolilli et al., 2019).

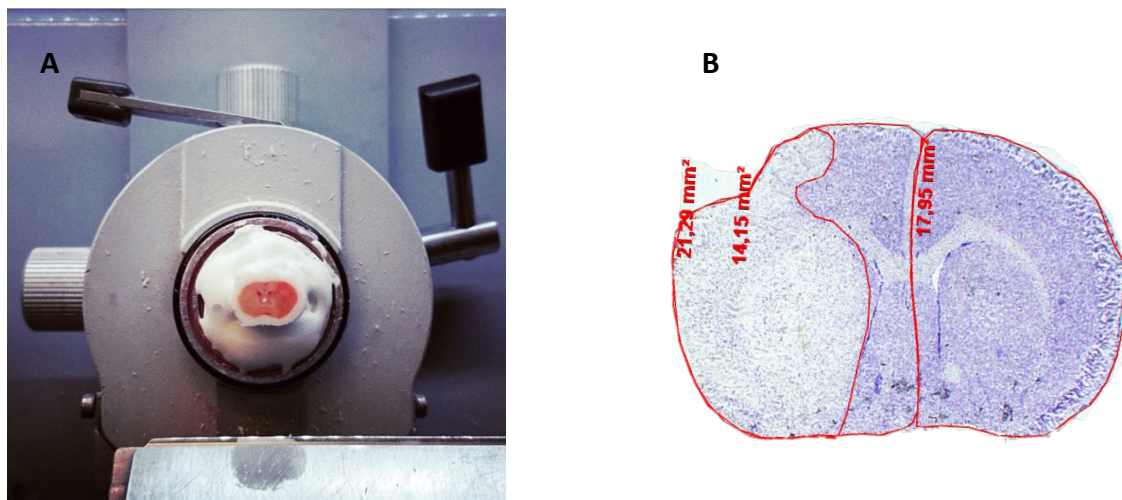


Abb. 5: **A** Anfertigung der Hirnschnitte am Kryostaten, **B** Gefrierschnitt in Nissl-Färbung

2.8 Tuscheinjektion

Um die Gefäßversorgung des Gehirns durch die A. communicans posterior darzustellen, wurde einer Versuchsgruppe 24 Stunden nach MCAo Tusche (Laco Office Products Finke GmbH, Sottrum, Deutschland) injiziert. Zunächst wurden die Tiere mit einer 3-Fach Kombi aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl anästhesiert. Anschließend wurden sie an einer Unterlage mittels Klebestreifen fixiert. Die Haut wurde entlang der Rippenbogen inzidiert und das Xyphoid mit einer Klemme festgehalten. Der Brustkorb wurde durch Einschnitt in das Zwerchfell mittels kleiner Scheren aufgeschnitten und der linke Ventrikel mit einer 25G Butterfly Nadel punktiert. Der rechte Vorhof wurde mit einer kleinen Schere geöffnet und NaCl-Lösung langsam in den linken Ventrikel injiziert. Sobald der Ausfluss aus dem rechten Vorhof klar wurde und die Leber fast weiß erschien, wurde 1 ml Tusche in den linken Ventrikel injiziert. Nach Dunkelfärbung von Zehen und Leber wurde der Schädel geöffnet, das Gehirn entnommen und in eine mit NaCl gefüllte Petrischale gelegt. Unter einem Mikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde das Versorgungsgebiet der A. communicans posterior fotografiert (Abb. 6), und die Ausprägung der A. communicans posterior wurde mit einem Score beurteilt (Abb. 7) (Murakami, Kondo et al., 1998).

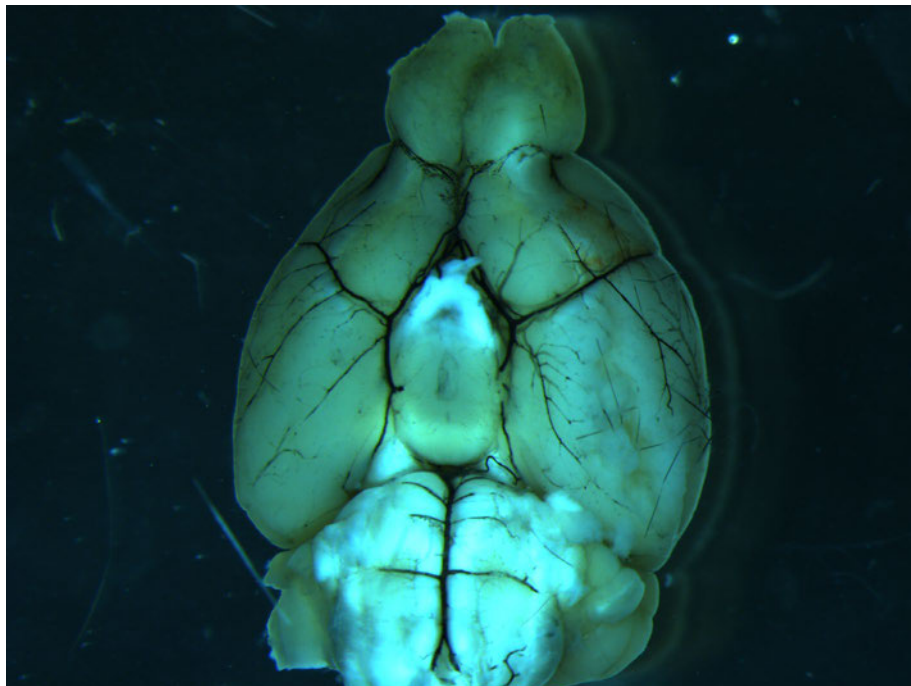


Abb. 6: Gehirnvaskularisation nach Tuscheinjektion

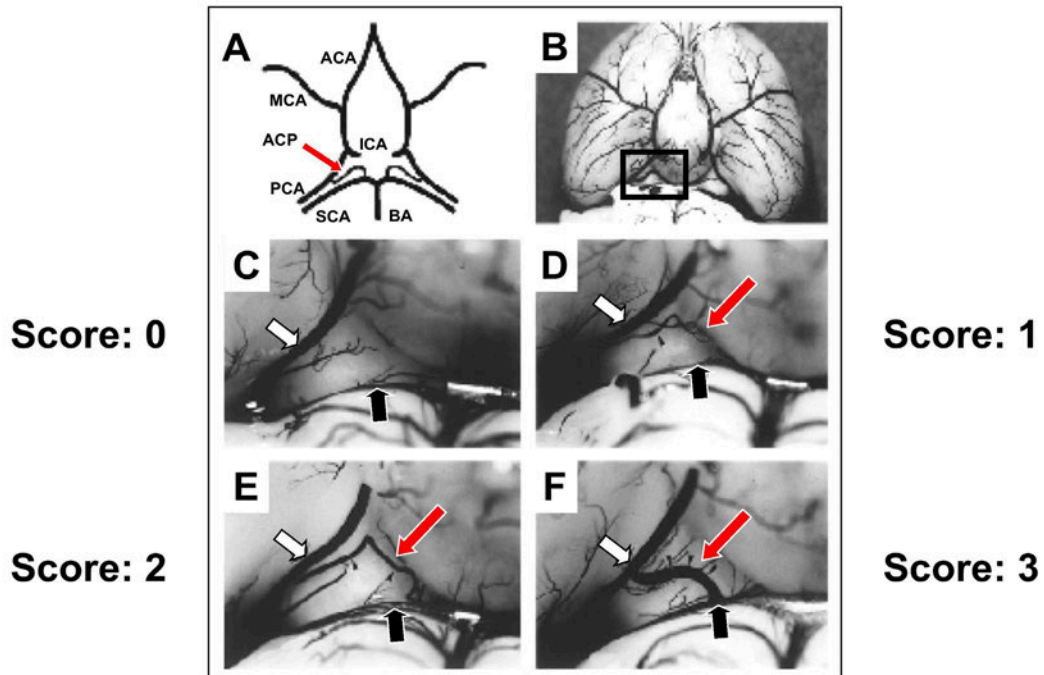


Abb. 7: Score zur Quantifizierung der zerebralen Gefäßanatomie bei der Maus.

A Schematische Übersicht über die Gehirnvascularisation der Maus, **B** Übersichtsbild zur Identifizierung der A. communicans posterior, **C** keine A. communicans posterior ausgebildet, **D** A. communicans posterior schwach ausgebildet, **E** A. communicans posterior mittelstark ausgebildet, **F** A. communicans posterior stark ausgebildet (aus Murakami, Kondo et al., 1998)

2.9 Thrombozytendepletion

Um Thrombozyten zu depletieren, wurde den Tieren ein anti-GPIIb/IIIa IgG Antikörper aus Ratten (emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland) intraperitoneal injiziert. Bei einer Dosis von 2 µg/g Körpergewicht wird die Thrombozytenzahl innerhalb von 60 Minuten für 48 Stunden um 95% reduziert. Als Kontrolle diente ein nicht-immunogenes Ratten-IgG (emfret Analytics, Eibelstadt, Deutschland).

2.10 Versuchsgruppen

Die Standardisierung zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des intraluminalen MCAo Modells wurde an n=10 Mäusen durchgeführt. Der Zeitpunkt der Reperfusion wurde mit 1 Stunde nach MCAo festgelegt.

Um den Einfluss der A. communicans posterior auf die Infarktgröße zu beurteilen, wurde einer Versuchsgruppe von n=9 Mäusen Tusche in den Körperkreislauf zur

Darstellung der Gehirnvaskularisation injiziert. Die Ausprägung der A. communicans posterior wurde mit einem Score versehen (Murakami, Kondo et al., 1998).

Die Experimente zur therapeutischen Depletion von Thrombozyten mittels GPIb Antikörper wurden an 7 Versuchsgruppen durchgeführt. Zum Zeitpunkt 0 Stunden nach MCAo wurde entweder Vehikel (n=9) oder GPIb Antikörper (n=7) verabreicht. In den anderen Gruppen wurden zu den Zeitpunkten 1 Stunde (n=8), 3 Stunden (n=6), 5 Stunden (n=8), 7 Stunden (n=7) und 12 Stunden (n=10) nach MCAo der GPIb Antikörper injiziert. Der Bederson Score wurde 1 und 24 Stunden nach MCAo erhoben, der Neuroscore und die Blutungszeit nach 24 Stunden. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Gehirn entnommen und nach dem oben beschriebenen Verfahren das Infarktvolume gemessen.

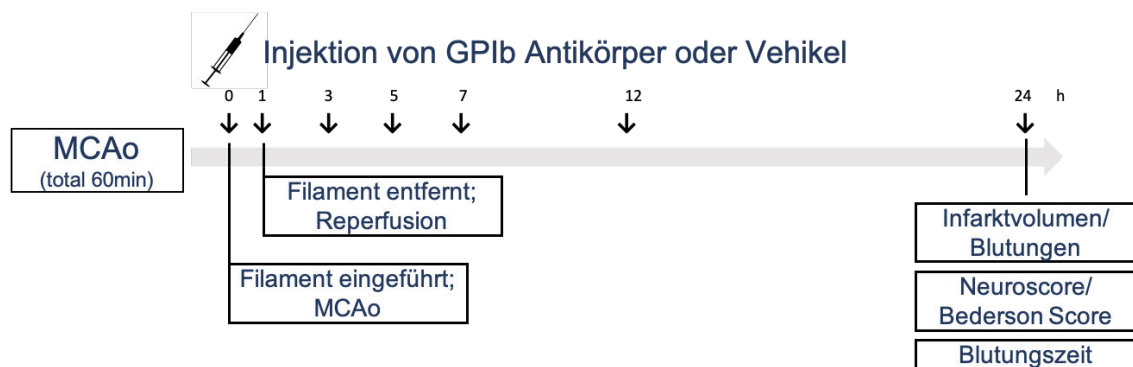


Abb. 8: Applikationsprotokoll des GPIb Antikörpers

2.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien). Die Übersichtsgrafiken sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung bei normalverteilten Daten bzw. als Median und 25./75. Perzentile bei nicht-normalverteilten Daten. Alle Datensätze wurden auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test geprüft. Normalverteilte Daten wurden mit dem One Way Anova-Test analysiert und der Tukey's Test wurde als post-hoc Verfahren genutzt. Die nicht-normalverteilten Versuchsgruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Als post-hoc Verfahren diente hier der Dunn's Test. Bei Vergleichen von zwei unverbundenen Gruppen wurde der Welch's t-test als Verfahren ausgewählt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Standardisierung

Bei der Standardisierung mit einer Versuchsgruppe von $n=10$ Mäusen lag das mittlere Infarktvolumen bei $100,5 \pm 37,4 \text{ mm}^3$ (Abb. 9). Auffällig war, dass die Hälfte der Tiere ein etwas größeres Infarktvolumen aufzeigte als die andere Hälfte, und dass besonders bei den hinteren Hirnschnitten eine größere Variabilität des Infarktvolumens bestand (Abb. 10 und Abb. 11). Teilte man die Versuchsgruppe in zwei Gruppen nach Infarktgröße auf, so zeigte das mittlere Infarktvolumen der einen Gruppe (Gruppe A) einen Wert von $132,4 \pm 23,4 \text{ mm}^3$ und das der anderen Gruppe (Gruppe B) einen Wert von $68,7 \pm 8,3 \text{ mm}^3$ (Abb. 10). Dieser Unterschied im Infarktvolumen der Tiere ist statistisch signifikant ($p<0,01$) und könnte auf eine unterschiedlich ausgeprägte Kollateralisierung der Gehirnvaskularisation zurückgeführt werden. Es wurde vermutet, dass die Morphologie der A. communicans posterior hierbei eine Rolle spielte. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde einer weiteren Versuchsgruppe Tusche in den Körperkreislauf injiziert, um die Gefäßvaskularisation und insbesondere die A. communicans posterior darzustellen.

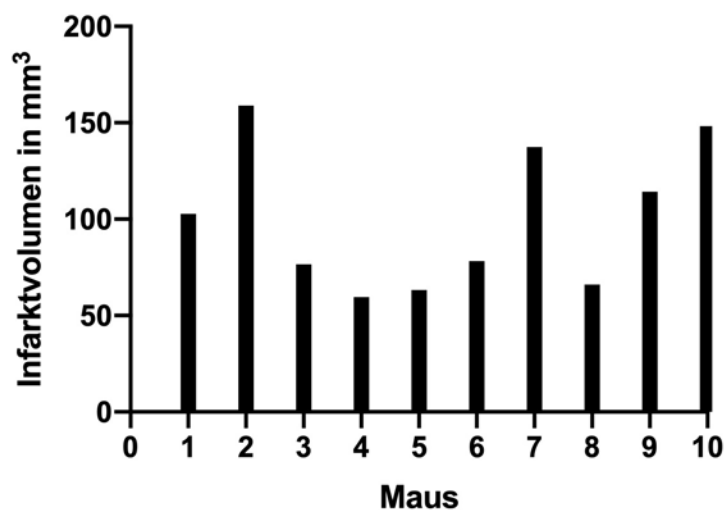


Abb. 9: Infarktvolumen der Standardisierung

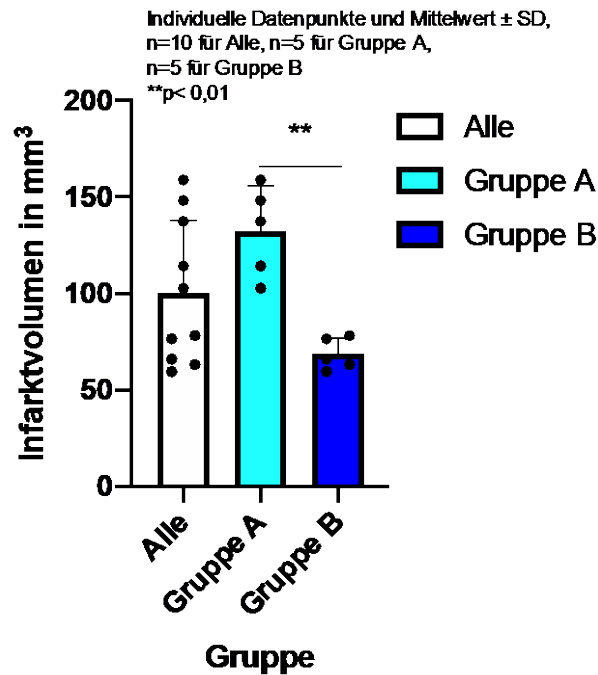


Abb. 10: Mittleres Infarktvolumen der Standardisierung in Gruppen aufgeteilt

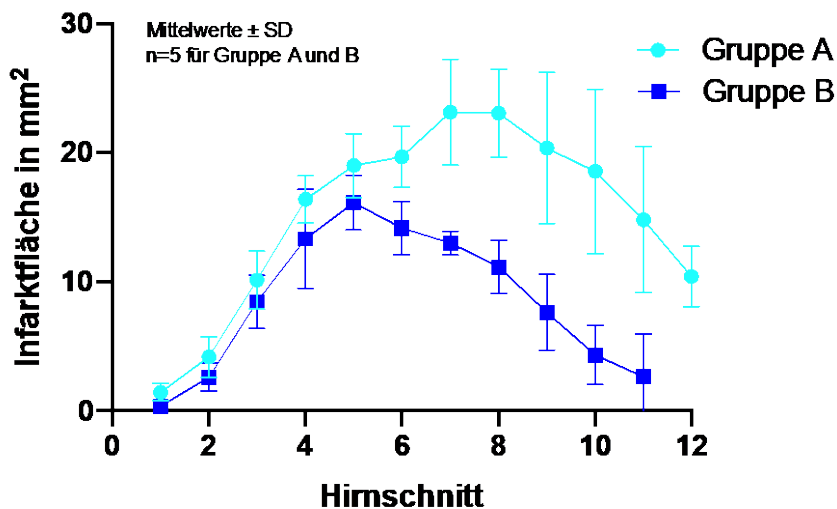


Abb. 11: Infarktfläche der Hirnschnitte der Standardisierung in Gruppen aufgeteilt

3.2 Tuscheinjektion

Die Tuscheinjektion zur Untersuchung der Gehirnvaskularisation wurde an n=9 Tieren durchgeführt (Abb. 12). Auch hier zeigte sich eine Gruppe mit einem etwas größeren mittleren Infarktvolumen von $123,1 \pm 12,3 \text{ mm}^3$ (Gruppe C) im Vergleich zu einer Gruppe mit einem kleineren mittleren Infarktvolumen von $59,8 \pm 27,5 \text{ mm}^3$ (Gruppe D) (Abb. 13). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Das gesamte mittlere Infarktvolumen betrug $87,9 \pm 39,3 \text{ mm}^3$. Die Hirnschnitte zeigten auch bei der

Tuscheinjektion in den hinteren Abschnitten eine größere Variabilität, was darauf hindeutete, dass wahrscheinlich eine unterschiedlich ausgeprägte Kollateralisierung eine Rolle spielte (Abb. 14).

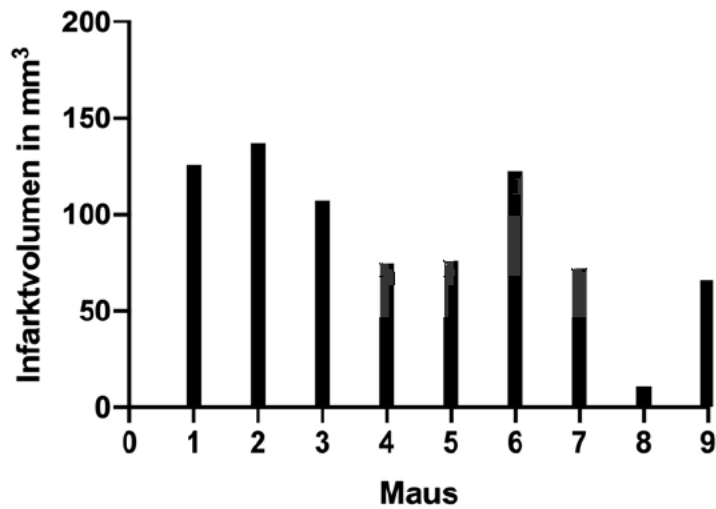


Abb. 12: Infarktvolume in der Tuscheinjektion

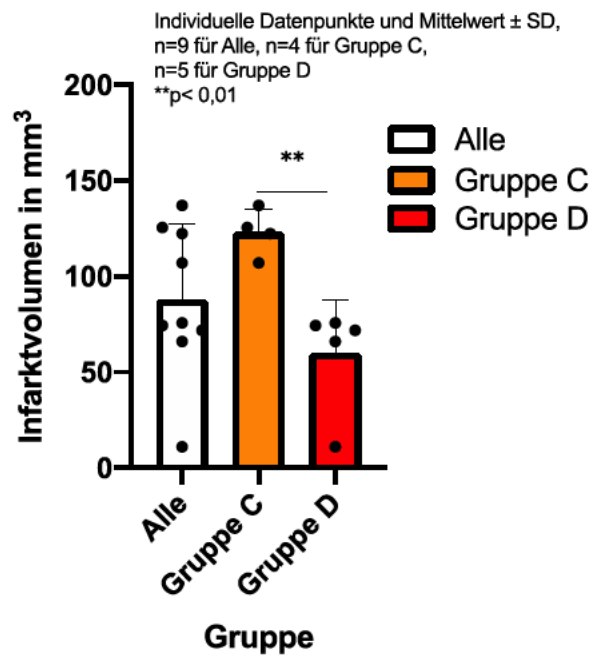


Abb. 13: Mittleres Infarktvolume in der Tuscheinjektion in Gruppen aufgeteilt

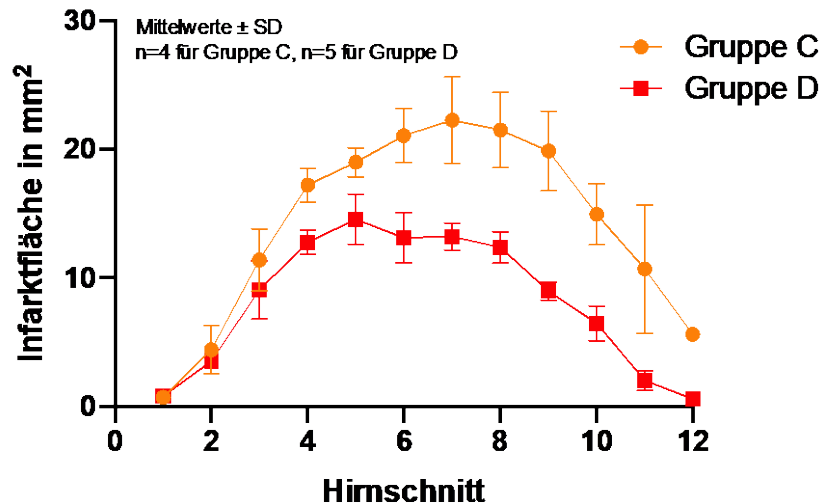


Abb. 14: Infarktfläche der Hirnschnitte von der Tuscheinjektion in Gruppen aufgeteilt

Die Infarktflächen der Standardisierungs- und der Tuscheinjektionsgruppe waren sich sehr ähnlich und wiesen auf eine gute Reproduzierbarkeit des Modells hin (Abb. 15).

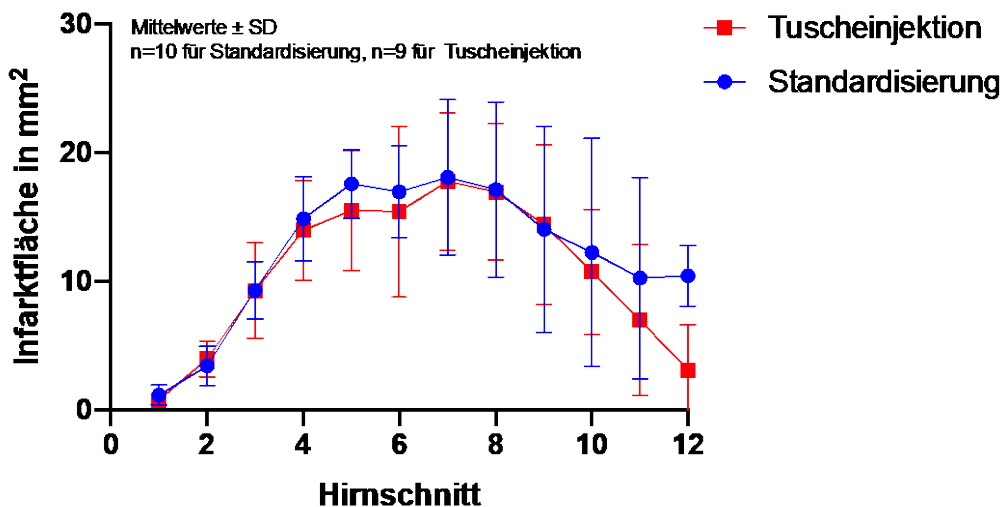


Abb. 15: Infarktfläche der Hirnschnitte von der Standardisierung und Tuscheinjektion kumuliert

Für die Ausprägung der *A. communicans posterior* wurde ein Score vergeben und anschließend wurde dieser mit dem Infarktvolumen in Korrelation gesetzt (Abb. 16). Eine Maus hatte ein sehr kleines Infarktvolumen von 11,0 mm³ (Abb. 12) und wurde daher bei dieser Analyse nicht berücksichtigt. Das Ergebnis war, dass keine Korrelation zwischen Infarktvolumen und *A. communicans posterior* bestand. Die mittleren Scores der *A. communicans posterior* in den Gruppen C und D zeigten

ebenfalls keinen Unterschied (Abb. 17). Die Abweichung im Infarktvolume der Tiere war dementsprechend auf andere Ursachen zurückzuführen als der Einfluss der A. communicans posterior.

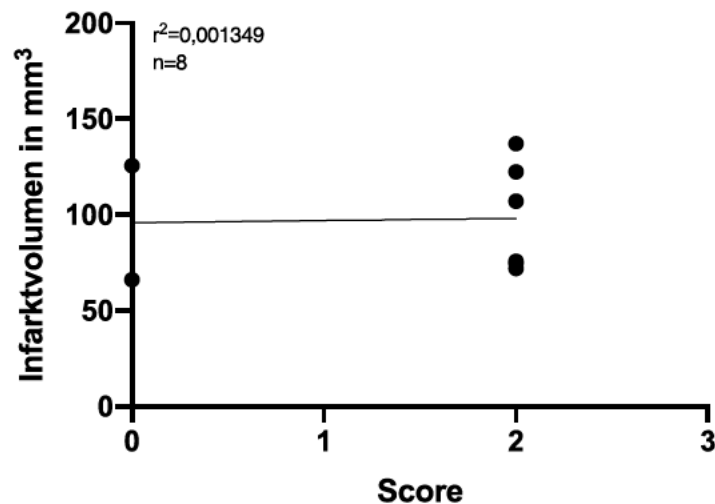


Abb. 16: Korrelation des Infarktvolume und des Scores der A. communicans posterior

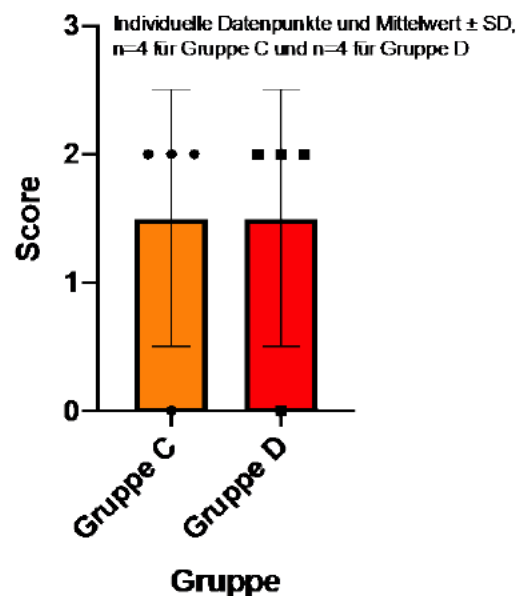


Abb. 17: Score der A. communicans posterior in den Gruppen C und D

Möglicherweise hatte die Operation nach dem MCAo Modell Einfluss auf das Infarktvolume. Als Parameter für die erfolgreiche Gefäßokklusion der A. cerebri media galt der Abfall des LDF-Werts. Der LDF-Wert fiel im Schnitt auf ca. 20% in beiden Gruppen ab. Einige Tiere in der Standardisierungsgruppe und der Tuscheinjektionsgruppe zeigten einen Abfall auf zwischen 20% und 40% (Abb. 18).

Setzte man das Infarktvolumen und den LDF-Wert in Beziehung, so zeigte sich keine Korrelation zwischen den beiden Kenngrößen (Abb. 19).

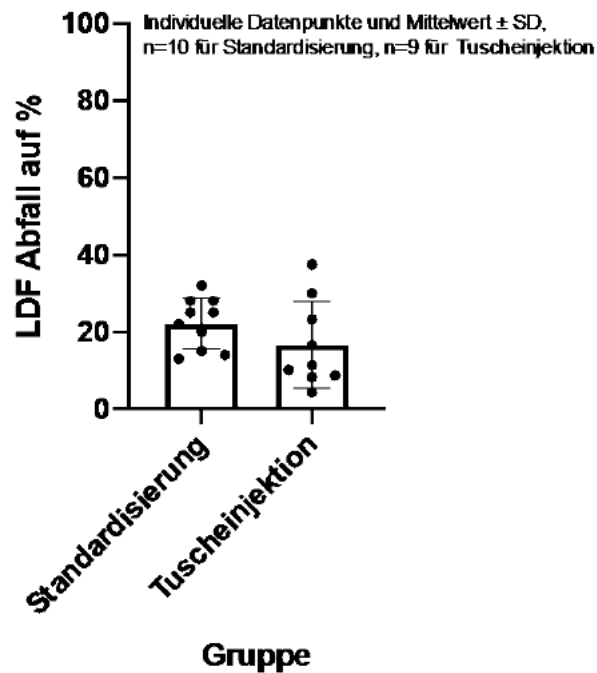


Abb. 18: LDF-Abfall der Standardisierungs- und der Tuscheinjektionsgruppe

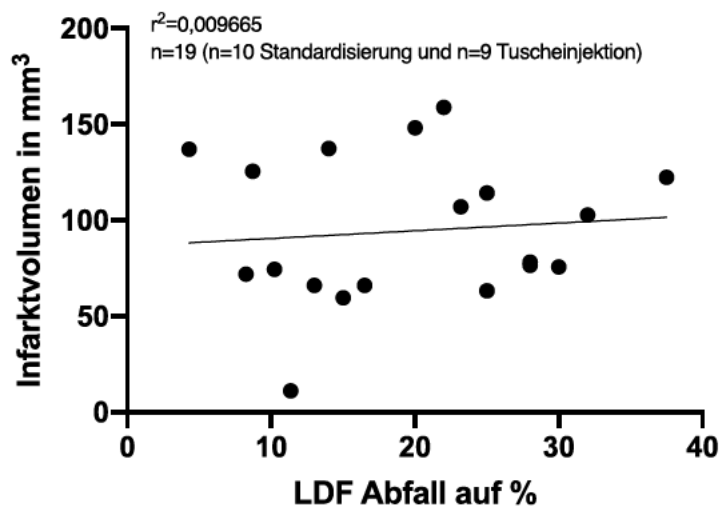


Abb. 19: Korrelation des Infarktvolumens und des LDF Abfalls

3.3 Therapeutische Depletion von Thrombozyten

Die Mortalitätsrate der einzelnen Versuchsgruppen nach 24 Stunden war unterschiedlich hoch (Abb. 20). Die frühere Antikörpergabe (0 bis 3 Stunden) ging mit einer erhöhten Mortalität einher als die Applikation zu einem späteren Zeitpunkt (5 bis 12 Stunden). Die 0 Stunden Vehikel Gruppe hatte eine ungewöhnlich hohe Mortalität von 22,2%. Ein Gehirn der 0 Stunden Vehikel Gruppe ist während der Untersuchung des Infarktolumens verloren gegangen. Die Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen verkleinerte sich in den folgenden Diagrammen auf n=6 für die 0 Stunden Vehikel Gabe, n=4 für die 0 Stunden Antikörpergabe, n=6 für die 1 Stunde Antikörpergabe, n=4 für die 3 Stunden Antikörpergabe, n=7 für die 5 Stunden Antikörpergabe, n=6 für die 7 Stunden Antikörpergabe und n=8 für die 12 Stunden Antikörpergabe (Abb. 21).

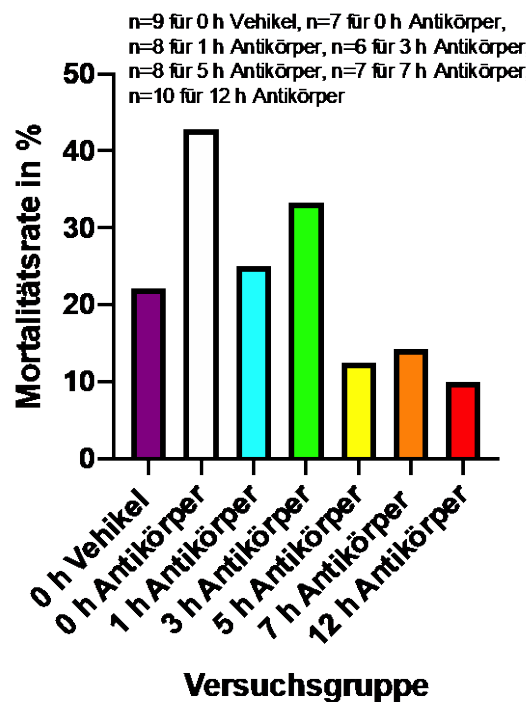


Abb. 20: Mortalitätsrate der einzelnen Versuchsgruppen nach 24 Stunden

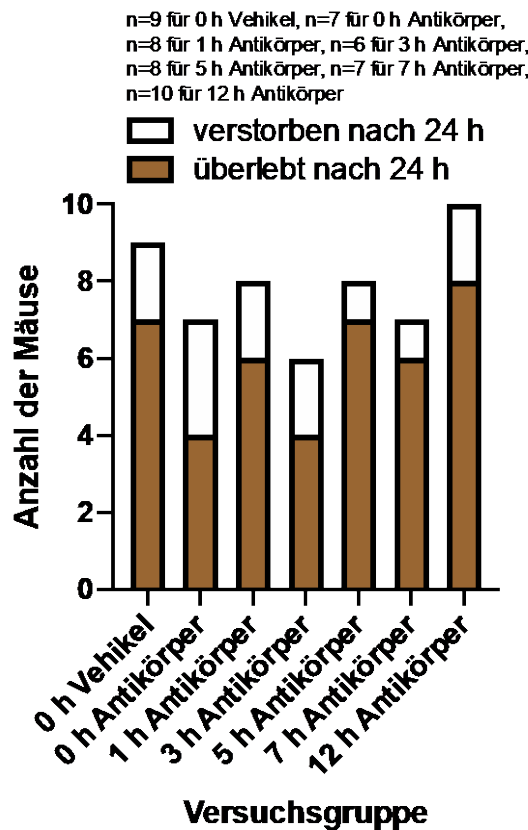


Abb. 21: Anzahl der verstorbenen Tiere nach 24 Stunden

Die Mediane des LDF-Wert Abfalls der einzelnen Versuchsgruppen lagen alle unter 20%, vereinzelt hatten Tiere in der 0 Stunden Vehikel Gruppe, der 1 Stunde Antikörper Gruppe oder der 12 Stunden Antikörper Gruppe höhere Werte (Abb. 22). Hinsichtlich des MCAo Modells waren die Versuchsgruppen damit vergleichbar.

Der Median der Blutungszeit der 0 Stunden Vehikel Gruppe lag bei 63 Sekunden, während die Werte der anderen Gruppen, die den Antikörper erhielten, sich bei Werten zwischen 168 und 240 Sekunden bewegten (Abb. 23). Der Cut-Off lag bei 240 Sekunden. Vereinzelt hatten die Versuchsgruppen der Antikörper Gabe niedrigere Blutungszeiten. Werte, die bei 0 Sekunden lagen, bedeuteten, dass diese Tiere nach Amputation von 3 mm der Schwanzspitze keine Blutungen aufzeigten.

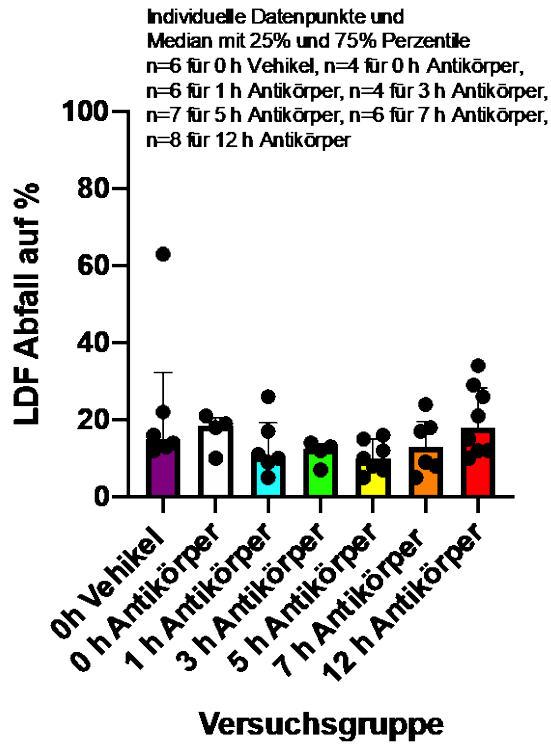


Abb. 22: LDF-Abfall der einzelnen Versuchsgruppen

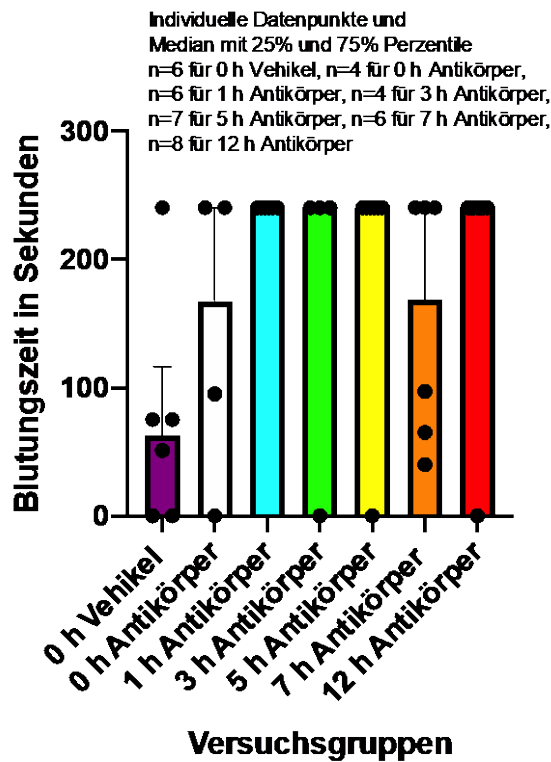


Abb. 23: Blutungszeit der einzelnen Versuchsgruppen

Zur Beurteilung der neurologischen Funktionen wurden der Bederson Score und der Neuroscore erhoben. Bei 0 Stunden Vehikel und 5 Stunden Antikörper Applikation waren die Mediane des Bederson Scores 24 Stunden nach MCAo leicht erniedrigt bei Werten von 1,5 (Abb. 24). Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede 1 und 24 Stunden nach MCAo sowie zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ($p=0,12$ bis $0,99$).

Die meisten Tiere in allen Versuchsgruppen hatten Werte im Neuroscore von knapp unter 20, vereinzelt traten höhere Werte auf (Abb. 25). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p=0,26$ bis $0,99$).

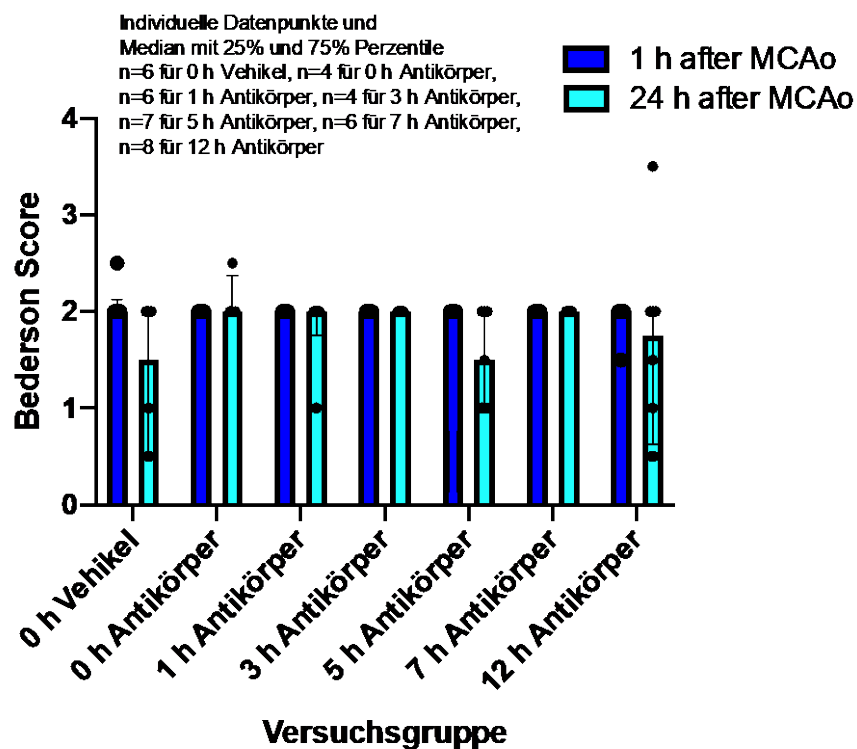


Abb. 24: Bederson Score der einzelnen Versuchsgruppen

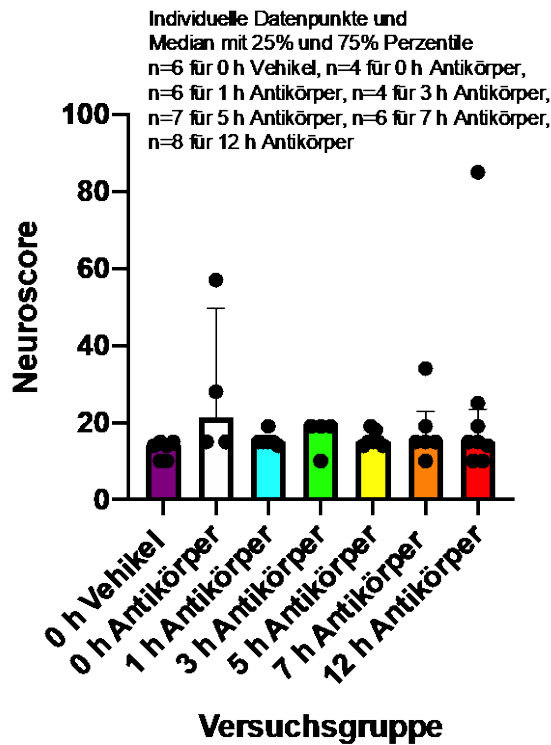


Abb. 25: Neuroscore der einzelnen Versuchsgruppen

Hinsichtlich des Infarkt volumens befanden sich alle Versuchsgruppen auf einem ähnlichen Niveau zwischen $61,7 \text{ mm}^3$ und $90,1 \text{ mm}^3$, bis auf die Versuchsgruppe, bei der der Antikörper nach 3 Stunden gegeben wurde (Abb. 26). Hier zeigte sich ein erniedrigter Median von $34,1 \text{ mm}^3$, wobei die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zeigt ($p=0,23$ bis $0,99$).

Die errechnete Hemisphärenschwellung in den einzelnen Versuchsgruppen wies eine hohe Variabilität auf (Abb. 27). Die 3 Stunden Antikörper Gruppe zeigte einen Median von $8,5\%$ während die restlichen Gruppen einen Median der Hemisphärenschwellung von um die 20% aufwiesen.

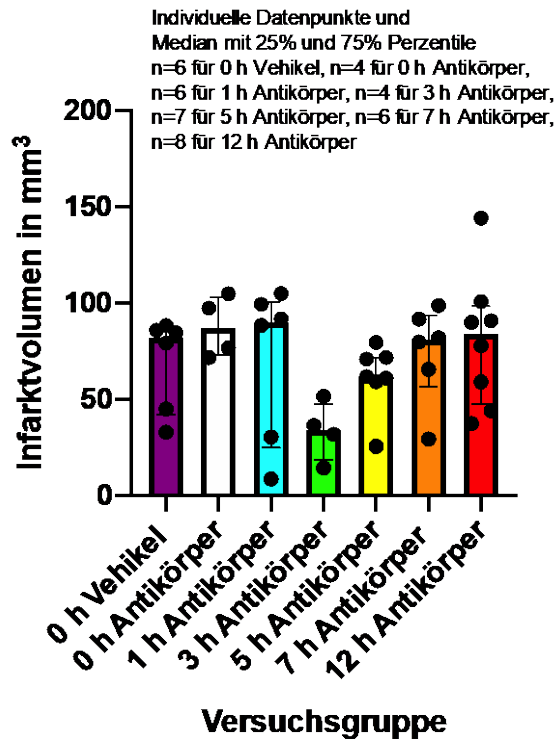


Abb. 26: Infarkt volumina der einzelnen Versuchsgruppen

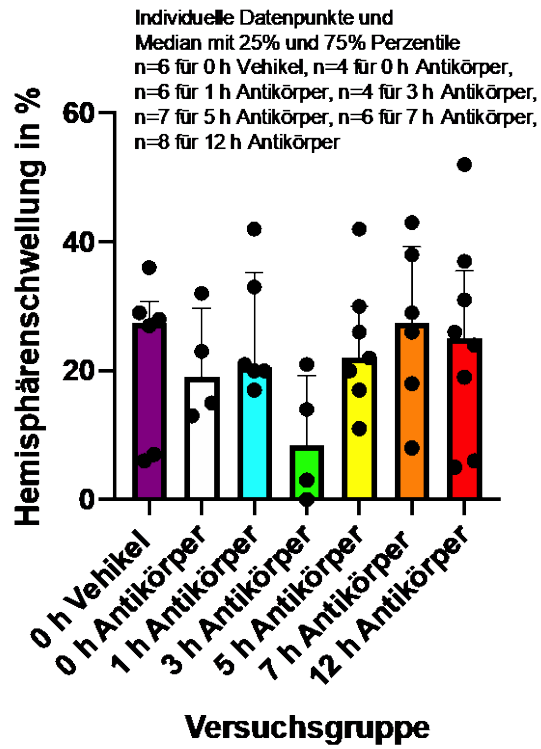


Abb. 27: Hemisphärenschwellung der einzelnen Versuchsgruppen

Für die Schwere der inneren Blutungen wurde ein Score von 0 bis 3 vergeben (Abb. 28).

Es fanden sich in allen Gruppen mit Antikörpergabe Tiere mit inneren Blutungen, besonders häufig in der 0 Stunden Antikörper-Gruppe und der 12 Stunden Antikörper-Gruppe. Bei der 0 Stunden Vehikel-Gruppe waren keine inneren Blutungen zu beobachten (Abb. 29)

Die Mediane der 0 Stunden Antikörper-, 3 Stunden Antikörper- und 7 Stunden Antikörper-Gruppen lagen mit einem Score von 2 am höchsten (Abb. 30).

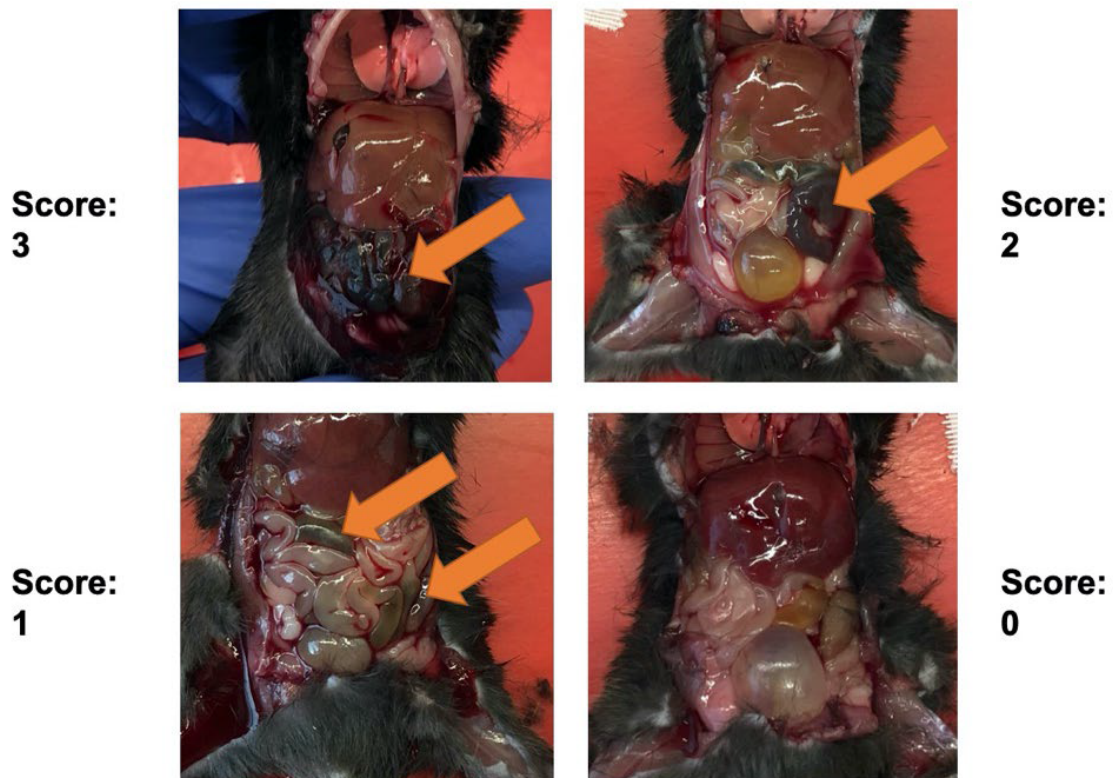


Abb. 28: Score zur Quantifizierung der inneren Blutungen

3 schwere innere Blutungen, **2** mittelschwere innere Blutungen, **1** geringe innere Blutungen, **0** keine inneren Blutungen

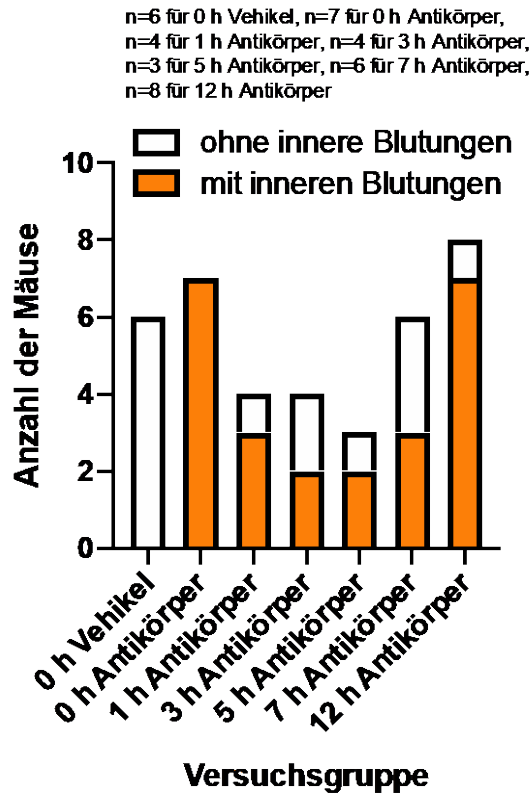


Abb. 29: Anzahl der Tiere mit inneren Blutungen

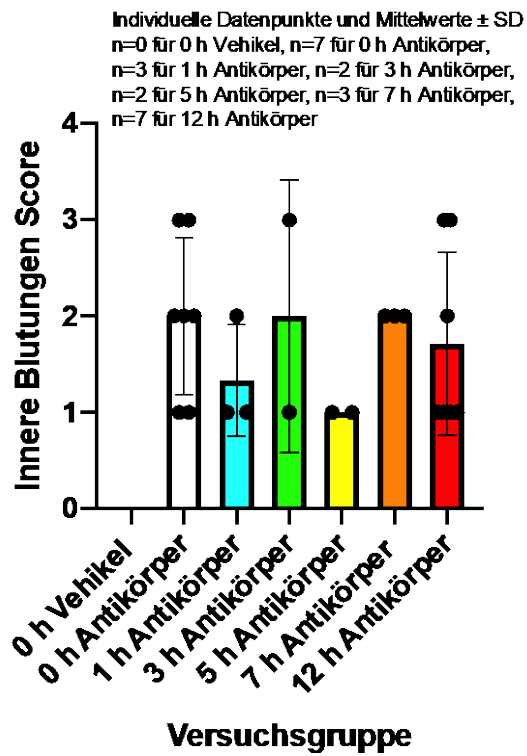


Abb. 30: Innere Blutungen Score der einzelnen Versuchsgruppen

Auch für die makroskopisch sichtbaren Hirnblutungen wurde ein Score von 0 bis 3 vergeben (Abb. 31). Alle Tiere, die Antikörper erhalten haben, hatten Hirnblutungen zu verzeichnen, während die Gruppe, die keinen Antikörper erhielt, davon ausgeschlossen blieb (Abb. 32).

Hohe Mediane des Scores waren bei der 0 Stunden Vehikel-Gruppe, der 1 Stunde Antikörper-Gruppe und der 7 Stunden Antikörper-Gruppe festzustellen (Abb. 33)

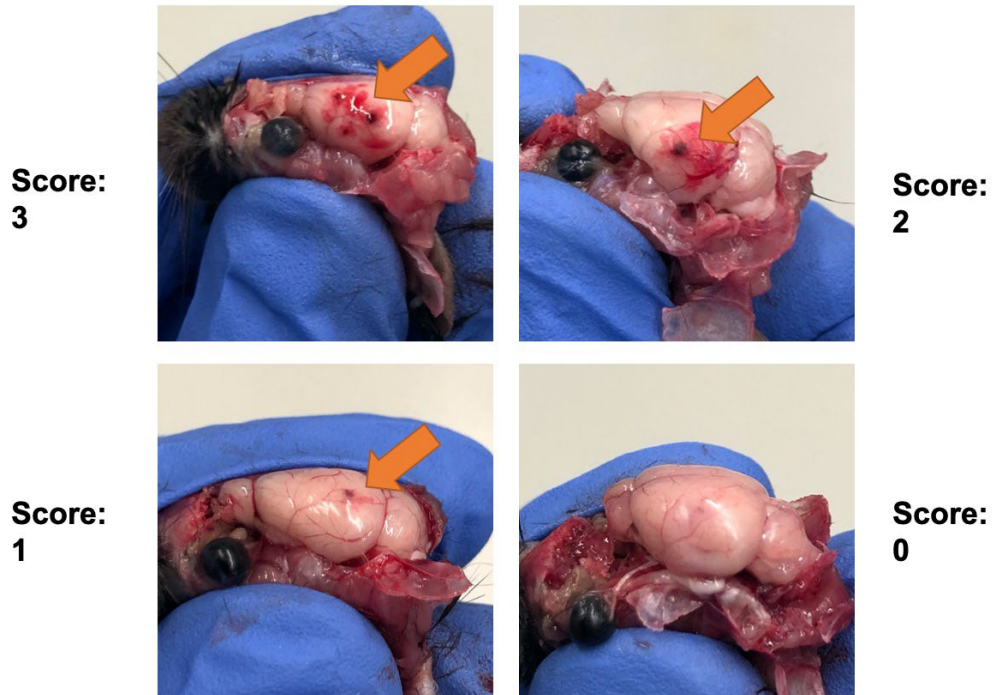


Abb. 31: Score zur Quantifizierung der Hirnblutungen

3 schwere Hirnblutungen, **2** mittelschwere Hirnblutungen, **1** geringe Hirnblutungen, **0** keine Hirnblutungen

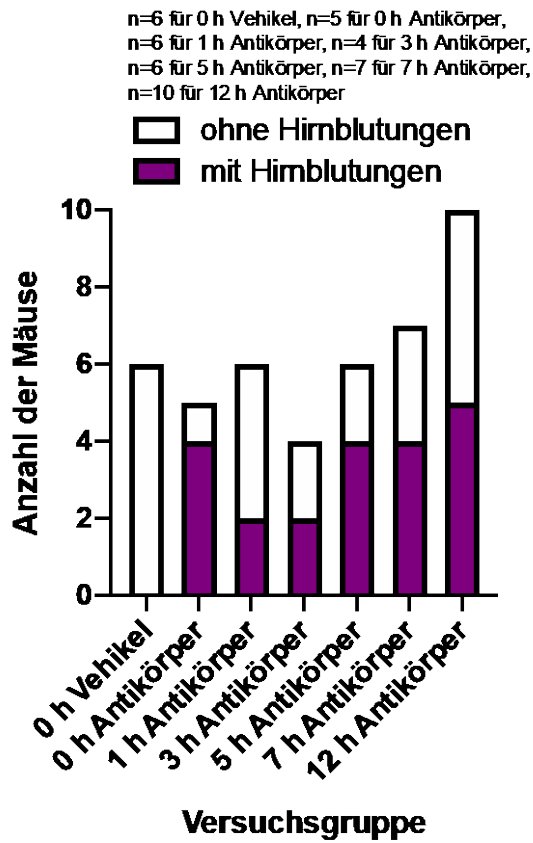


Abb. 32: Anzahl der Tiere mit Hirnblutungen

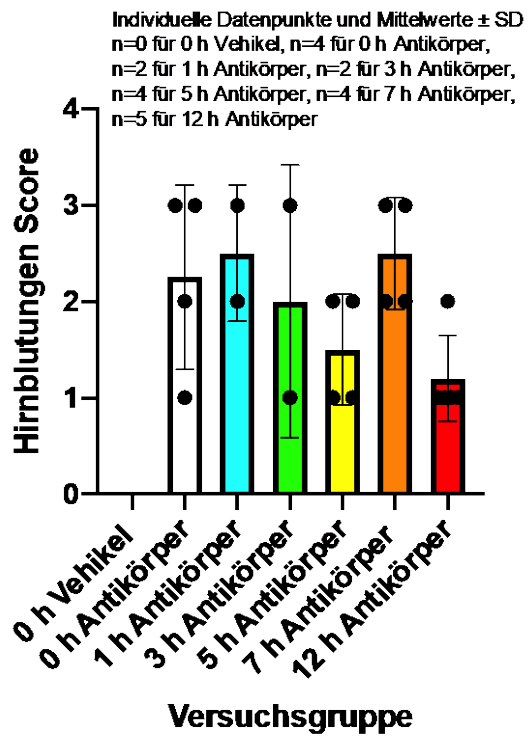


Abb. 33: Hirnblutungen Score der einzelnen Versuchsgruppen

4. Diskussion

4.1 Methoden

Tierversuche sind essenziell für die Erforschung der Mechanismen des ischämischen Schlaganfalls und für die Entwicklung neuer Therapien. Dies hat mehrere Gründe: Während der ischämische Schlaganfall beim Menschen extrem variabel ist in seinen Manifestationen, Ursachen und anatomischen Lokalisationen, ist der experimentelle Schlaganfall höchst reproduzierbar, gut kontrollierbar und standardisierbar. Außerdem erfordern molekulare, genetische, biochemische und physiologische Untersuchungen oft einen direkten Zugang zum Hirngewebe. Zudem können die Perfusion und Gefäßvaskularisation nicht in in-vitro-Modellen untersucht werden. (Fluri, Schuhmann et al., 2015).

Heutzutage werden in der experimentellen Schlaganfallforschung vor allem Mäuse und Ratten als Modellorganismen verwendet. Sie haben geringere Anschaffungs- sowie Haltungskosten als größere Säugetiere und erlauben somit größere Gruppengrößen. Des Weiteren gestaltet sich das Monitoring und die Gewebeaufbereitung einfacher und auch ethisch werden Versuche an Nagetieren als vertretbarer angesehen (Sommer, 2017). Außerdem ist die zerebrale Gefäßversorgung vergleichbar zu der des Menschen. Für Mäuse spricht auch, dass eine große Zahl an transgenen Linien zur Verfügung steht mit denen Komorbiditäten wie Hypertension, Atherosklerose, Diabetes oder Adipositas modelliert werden können (Macrae, 2011).

Das intraluminale MCAo Modell ist mit dem ischämischen Schlaganfall beim Menschen vergleichbar, der oft aus einem Verschluss der A. cerebri media resultiert. Ferner bildet sich eine Penumbra, die sich auch beim Menschen wiederfindet. Das Infarktvolument ist groß und es ist eine gute Reproduzierbarkeit vorhanden. Die Reperfusion und damit die Ischämiezeit sind ebenfalls gut kontrollierbar und die Methode ist relativ einfach und schnell durchzuführen (Fluri, Schuhmann et al., 2015). Als Limitation des Modells ist die hohe Variabilität des Infarktvolument zu nennen (Tajiri, Dailey et al., 2013), wie auch in der Standardisierung und in der Versuchsgruppe mit der Tuscheinjektion zu erkennen war. Während beim ischämischen Schlaganfall des Menschen die Gefäßokklusion oftmals nicht komplett ist und eine teilweise spontane Reperfusion aufgrund einer fortlaufenden Auflösung

der Thrombus vorhanden ist, führt beim MCAo Modell das Zurückziehen des Filaments zu einer sofortigen Reperfusion. Dies mag die Situation nach einer mechanischen Thrombektomie am meisten gleichkommen (Sommer, 2017).

Andere Modelle des ischämischen Schlaganfalls sind das Kraniektomie-Modell, das Photothrombose-Modell, das Endothelin-1-Modell und das Embolie-Modell.

Beim Kraniektomie-Modell wird das zerebrale Gefäß direkt per Clipping, Ligation, Haken, Kauterisation und Durchschneidung okkludiert. Dafür ist eine Kraniektomie mit Eröffnung der Dura mater erforderlich, um die Region der A. cerebri media freizulegen. Vorteile dieses Modells sind die gute Reproduzierbarkeit des Infarkt volumens und des neurologischen Defizits, die niedrige Mortalität und die visuelle Bestätigung einer erfolgreichen Okklusion der A. cerebri media. Nachteilig sind eine mögliche Hirnschädigung durch die Kraniektomie, die Beeinflussung des intrakraniellen Drucks, die geringen neurologischen Defizite sowie die anspruchsvolle Operationstechnik (Fluri, Schuhmann et al., 2015).

Beim Photothrombose-Modell wird den Tieren ein photosensitiver Farbstoff appliziert und das Gehirn anschließend mit Licht einer spezifischen Wellenlänge beleuchtet. Die Beleuchtung aktiviert den Farbstoff, was zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Superoxiden führt, die wiederum zum Endothelschaden, zur Plättchenaktivierung und -aggregation beitragen. Diese Mechanismen bewirken im beleuchteten Areal eine kortikale ischämische Läsion. Stärken dieses Modells sind die Möglichkeit den ischämischen Infarkt an einer beliebigen Stelle zu induzieren, die hohe Reproduzierbarkeit und die niedrige Mortalität. Auf der anderen Seite fehlt in diesem Modell die Penumbra und die kollaterale Durchblutung, sodass die translationale Bedeutung des Modells beeinträchtigt ist (Sommer, 2017).

Das Endothelin-1 Modell basiert auf den vasokonstriktorisches Eigenschaften des Peptids Endothelin-1, welches auf das exponierte Gefäß direkt auf die Hirnoberfläche oder stereotaktisch in das Hirngewebe appliziert werden kann und somit zur Vasokonstriktion und zu einer nachgeschalteten Ischämie führt. Mit der Konzentration von Endothelin-1 kann die Schwere und Dauer der Ischämie und somit das

Infarkt volumen modifiziert werden. Jedoch verursacht die Applikation von Endothelin-1 eine Proliferation der Astroglia (Sommer, 2017).

Embolische Schlaganfall-Modelle können in zwei Gruppen unterschieden werden: Mikrosphäre/Makrosphäre-induzierte Schlaganfall-Modelle und thromboembolische Modelle. Beim Mikrosphäre-Modell werden Dextran-, Titanium-, Dioxid- oder Keramik-Kügelchen mit einem Durchmesser von 20 bis 50 μm in die A. cerebri media oder A. carotis interna eingeführt, die passiv in die zerebrale Zirkulation gespült werden und zu multifokalen und heterogenen Infarkten führen. Das Makrosphären-Modell verwendet Kügelchen von 100 bis 400 μm Durchmesser, die in die A. carotis interna instilliert werden und somit zu reproduzierbaren Okklusionen des Abgangs der A. cerebri media führen.

Das thromboembolische Modell basiert auf der Applikation von spontan geformten oder thrombin-induziertem Thromben aus autologem Blut. Eine andere Verfahrensweise ist die direkte Injektion von Thrombin in den intrakraniellen Abschnitt der A. carotis interna oder A. cerebri media. Diese Modelle imitieren den thromboembolischen Infarkt am ehesten, führen jedoch zu sehr variablen Infarktgrößen (Fluri, Schuhmann et al., 2015).

4.2 Ergebnisse

Wie in vorherigen Arbeiten beschrieben, deutet ein LDF-Abfall auf unter 20% auf eine korrekte Lage des Okklusionsfadens und damit auf einen ausreichenden Verschluss der A. cerebri media hin (Panahpour, Terpolilli et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit hatten alle Versuchsgruppen bis auf vereinzelte Ausnahmen einen LDF-Abfall auf unter 20%. Auch wenn das Infarktvolumen nicht direkt mit dem LDF-Abfall korreliert, wie auch in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Ingberg, Dock et al., 2018, McCabe, Arroja et al., 2018), so führt die Messung dieses Parameters zu einer guten Reproduzierbarkeit des Modells.

Die kleine Gruppengröße (n=4 bis 8) stellt eine Begrenzung der vorliegenden Arbeit dar. Auch die Variabilität des Infarktvolumens, wie in der Standardisierung zu sehen war, stellt eine Limitation dar. Zudem hat die technische Expertise des Operateurs Einfluss auf die Variabilität des Modells.

In unserer Arbeitsgruppe liegt die Mortalitätsrate 24 Stunden nach MCAo bei ca. 0 bis 10% (Lourbopoulos, Mamrak et al., 2017, Panahpour, Terpolilli et al., 2019). In der Standardisierung und in der Tuscheinjektion haben alle Tiere 24 Stunden nach MCAo überlebt. In der Versuchsreihe der Thrombozytendepletion hatte bereits die Vehikel Gruppe aus bisher nicht geklärten Gründen eine hohe Mortalität von 22%. Die erhöhte Mortalität in den anderen Versuchsgruppen ist sehr wahrscheinlich durch die Antikörpergabe zu Stande gekommen, die mit massiven Nebenwirkungen, wie innere Blutungen und Hirnblutungen, vergesellschaftet war.

Die Blutungszeit war nach Antikörpergabe in allen Versuchsgruppen verlängert. Damit konnte die Depletion der Thrombozyten durch die Antikörpergabe bestätigt werden (Morowski, Vogtle et al., 2013).

Der Bederson Score zeigte keine signifikante Verbesserung 24 Stunden nach MCAo. Ebenso war der Neuroscore bei fast allen Tieren knapp unter 20. Daraus kann geschlossen werden, dass die Depletion von Thrombozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach MCAo keine Neuroprotektion aufweist und die neurologische Funktion der Tiere nicht verbessert, wenn nicht sogar verschlechtert.

Bei den Tieren, die die Beobachtungszeit überlebt haben, zeigte sich hinsichtlich des Infarktvolumens kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Das erniedrigte Infarktvolumen in der 3 Stunden Antikörper-Gruppe kann darauf zurückzuführen sein, dass die Tiere mit einem größeren Infarktvolumen verstorben waren und daher nicht in die Berechnung mit eingingen. Die gleiche Erklärung gilt sehr wahrscheinlich auch für die geringere Hemisphärenschwellung in dieser Versuchsgruppe.

Die Beobachtung hinsichtlich des Infarktvolumens und des Bederson Scores decken sich nicht mit den Beschreibungen von Morowski, Vogtle und Kollegen. In deren Publikation zeigte die Reduzierung der zirkulierenden Thrombozyten um >90% eine Verringerung des Infarktvolumens auf ein Drittel der Kontrollgruppe und eine verbesserte neurologische Funktion. Im Unterschied zu unseren Versuchen wurden jedoch 100 µg GPIIb Antikörper pro Maus appliziert und dies geschah 12 Stunden vor MCAo (Morowski, Vogtle et al., 2013). Wir verwendeten 40 µg pro Maus (2 µg/g

Körpergewicht bei 20 g schweren Mäusen), wobei auch eine Plättchendepletion von >95% erreicht wurde. Zudem können wir die Beobachtung, keine größeren intrakraniellen Blutungen bei den Tieren bemerkt zu haben, nicht bestätigen, da in allen unseren Versuchsgruppen mit Antikörpergabe Tiere mit intrakraniellen und inneren Blutungen auftraten. Unsere Beobachtungen werden durch Experimente aus Denisa D. Wagners Gruppe bestätigt, die zeigen, dass thrombozytopenische Mäuse sehr wohl Blutungen aufweisen können (Goerge, Ho-Tin-Noe et al., 2008).

In der Einleitung wurde aufgeführt, dass verschiedene Studien gezeigt haben, dass eine Blockade der Thrombozyten-Rezeptoren GPIb und GPVI das Infarktvolumen verringert und das neurologische Ergebnis verbessert haben (Kleinschnitz, Pozgajova et al., 2007, De Meyer, Schwarz et al., 2011, Kraft, Schuhmann et al., 2015, Li, Fan et al., 2015, Schuhmann, Guthmann et al., 2017).

Außerdem wurde dargestellt, dass Thrombozyten in der ischämischen Läsion akkumulieren und an der Pathogenese des postischämischen Schadens (wahrscheinlich durch Mikrothrombosen und inflammatorische Prozesse) beteiligt sind (Obrenovitch and Hallenbeck, 1985, Choudhri, Hoh et al., 1998, Burkard, Vogtle et al., 2020).

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sprechen dagegen. Es konnte - unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt der Antikörper gegeben wurde - keine Verbesserung im Infarktvolumen und in der neurologischen Funktion beobachtet werden. Zudem traten gravierende systemische Nebenwirkungen wie innere Blutungen und Hirnblutungen bei der Antikörpergabe auf. Thrombozyten sind demnach wichtig für die Hämostase und sind nicht nur für die Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls. Es erscheint daher sinnvoll, wie auch schon gesehen, einzelne Rezeptoren zu blockieren, ohne die komplette Funktion der Thrombozyten zu beeinträchtigen. Der Weg geht in Richtung Modulation der Thrombozyten-Funktion, wobei die Blockade des GPIb- und des GPVI-Rezeptor besonders vielversprechend zu sein scheinen. Es sind in jedem Fall noch weitere Experimente nötig, um die genaue Rolle der Thrombozyten beim Schlaganfall aufzuschlüsseln. Diese Arbeit zeigt, dass die Depletion von Thrombozyten nach Schlaganfall keine therapeutische Option darstellt. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um zu verstehen, wie lange nach einem Schlaganfall die Hemmung der Thrombozytenfunktion möglicherweise sinnvoll sein könnte.

5. Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist in der Europäischen Union die zweithäufigste Todesursache und einer der maßgeblichen Ursachen für Behinderungen im Erwachsenenalter (Wafa, Wolfe et al., 2020).

Es stehen momentan zwei Therapiemöglichkeiten zur Verfügung: die intravenöse Gabe von tPA bis 4,5 Stunden nach Symptombeginn und die endovaskuläre Thrombektomie bei Verschluss von großen hirnersorgenden Gefäßen bis zu 6 Stunden nach Symptombeginn (Meschia and Brott, 2018).

Thrombozyten, die eine wichtige Rolle in der Hämostase spielen, haben auch in der Pathophysiologie des Schlaganfalls eine wichtige Funktion. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors der Thrombozyten, der für die initiale Adhäsion der Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand verantwortlich ist, das Infarktvolumen nach MCAo in Mäusen verringert und das neurologische Ergebnis verbessert (Kleinschnitz, Pozgajova et al., 2007, Pham, Helluy et al., 2011, Kraft, Schuhmann et al., 2015, Schuhmann, Guthmann et al., 2017). Die Hypothese bestand also, dass Thrombozyten zum postschämischen Hirnschaden beitragen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, wie groß das therapeutische Zeitfenster der Thrombozyten Depletion ist. Dazu wurden 0, 1, 3, 5, 7 oder 12 Stunden nach einem experimentellen Schlaganfall bei Mäusen ein thrombozytendepletierender Antikörper appliziert und die Tiere im Anschluss histologisch und neurologisch evaluiert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Infarktvolumen und in der neurologischen Funktion gezeigt werden. Die Tiere wiesen jedoch nach Antikörper-Gabe starke innere Blutungen sowie Hirnblutungen auf, die das Überleben der Tiere sehr wahrscheinlich verschlechtert haben. Diese gravierende systemische Nebenwirkung der GPIIb/IIIa-Antikörpergabe spricht, entgegen bisheriger Veröffentlichungen, gegen dessen therapeutischen Applikation in der klinischen Praxis. In dieser Arbeit konnte die neuroprotektive Wirkung der GPIIb/IIIa Blockade, wie bisher in der Literatur beschrieben, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, der Antikörper scheint sogar schädliche Auswirkungen zu haben. Es sind daher weitere Experimente nötig, um die genaue Wirkung einer therapeutischen Depletion von Thrombozyten nach experimentellem Schlaganfall zu erforschen.

6. Literaturverzeichnis

Aho, K., P. Harmsen, S. Hatano, J. Marquardsen, V. E. Smirnov and T. Strasser (1980). "Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study." Bull World Health Organ **58**(1): 113-130.

Ansari, S., H. Azari, D. J. McConnell, A. Afzal and J. Mocco (2011). "Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice." J Vis Exp(51).

Bederson, J. B., L. H. Pitts, M. Tsuji, M. C. Nishimura, R. L. Davis and H. Bartkowski (1986). "Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination." Stroke **17**(3): 472-476.

Burkard, P., T. Vogtle and B. Nieswandt (2020). "Platelets in Thrombo-Inflammation: Concepts, Mechanisms, and Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke." Hamostaseologie **40**(2): 153-164.

Catanese, L., J. Tarsia and M. Fisher (2017). "Acute Ischemic Stroke Therapy Overview." Circ Res **120**(3): 541-558.

Choudhri, T. F., B. L. Hoh, H. G. Zerwes, C. J. Prestigiacomo, S. C. Kim, E. S. Connolly, Jr., G. Kottirsch and D. J. Pinsky (1998). "Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation." J Clin Invest **102**(7): 1301-1310.

Clemetson, K. J. (2012). "Platelets and primary haemostasis." Thromb Res **129**(3): 220-224.

De Meyer, S. F., T. Schwarz, D. Schatzberg and D. D. Wagner (2011). "Platelet glycoprotein Iba α is an important mediator of ischemic stroke in mice." Exp Transl Stroke Med **3**: 9.

del Zoppo, G. J. (1998). "The role of platelets in ischemic stroke." Neurology **51**(3 Suppl 3): S9-14.

Denorme, F. and S. F. De Meyer (2016). "The VWF-GPIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models." Thromb Haemost **116**(4): 597-604.

Deppermann, C., D. Cherpokova, P. Nurden, J. N. Schulz, I. Thielmann, P. Kraft, T. Vogtle, C. Kleinschnitz, S. Dutting, G. Krohne, S. A. Eming, A. T. Nurden, B. Eckes, G. Stoll, D. Stegner and B. Nieswandt (2013). "Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice." J Clin Invest.

Deppermann, C., P. Kraft, J. Volz, M. K. Schuhmann, S. Beck, K. Wolf, D. Stegner, G. Stoll and B. Nieswandt (2017). "Platelet secretion is crucial to prevent bleeding in the ischemic brain but not in the inflamed skin or lung in mice." Blood **129**(12): 1702-1706.

- Dietrich, W. D., S. Dewanjee, R. Prado, B. D. Watson and M. K. Dewanjee (1993). "Transient platelet accumulation in the rat brain after common carotid artery thrombosis. An ¹¹¹In-labeled platelet study." Stroke **24**(10): 1534-1540.
- Eltzschig, H. K. and T. Eckle (2011). "Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation." Nat Med **17**(11): 1391-1401.
- Fluri, F., M. K. Schuhmann and C. Kleinschnitz (2015). "Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research." Drug Des Devel Ther **9**: 3445-3454.
- Gelderblom, M., F. Leyboldt, K. Steinbach, D. Behrens, C. U. Choe, D. A. Siler, T. V. Arumugam, E. Orthey, C. Gerloff, E. Tolosa and T. Magnus (2009). "Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke." Stroke **40**(5): 1849-1857.
- Goerge, T., B. Ho-Tin-Noe, C. Carbo, C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, B. Q. Zhao, S. M. Cifuni and D. D. Wagner (2008). "Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia." Blood **111**(10): 4958-4964.
- Hankey, G. J. (2017). "Stroke." Lancet **389**(10069): 641-654.
- Harrington, D. K., F. Fragomeni and R. S. Bonser (2007). "Cerebral perfusion." Ann Thorac Surg **83**(2): S799-804; discussion S824-731.
- Hoffmann, U., H. Sheng, C. Ayata and D. S. Warner (2016). "Anesthesia in Experimental Stroke Research." Transl Stroke Res **7**(5): 358-367.
- Hossmann, K. A. (2012). "The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research." J Cereb Blood Flow Metab **32**(7): 1310-1316.
- Ingberg, E., H. Dock, E. Theodorsson, A. Theodorsson and J. O. Strom (2018). "Effect of laser Doppler flowmetry and occlusion time on outcome variability and mortality in rat middle cerebral artery occlusion: inconclusive results." BMC Neurosci **19**(1): 24.
- Jafar, J. J., R. Menoni, H. Feinberg, G. LeBreton and R. M. Crowell (1989). "Selective platelet deposition during focal cerebral ischemia in cats." Stroke **20**(5): 664-667.
- Kataoka, H., S. W. Kim and N. Plesnila (2004). "Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab **24**(6): 668-676.
- Kleinschnitz, C., S. F. De Meyer, T. Schwarz, M. Austinat, K. Vanhoorelbeke, B. Nieswandt, H. Deckmyn and G. Stoll (2009). "Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke." Blood **113**(15): 3600-3603.
- Kleinschnitz, C., M. Pozgajova, M. Pham, M. Bendszus, B. Nieswandt and G. Stoll (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**(17): 2323-2330.

Kochanek, P. M., A. J. Dutka, K. K. Kumaroo and J. M. Hallenbeck (1988). "Effects of prostacyclin, indomethacin, and heparin on cerebral blood flow and platelet adhesion after multifocal ischemia of canine brain." Stroke **19**(6): 693-699.

Koupenova, M., L. Clancy, H. A. Corkrey and J. E. Freedman (2018). "Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis." Circ Res **122**(2): 337-351.

Kraft, P., M. K. Schuhmann, F. Fluri, K. Lorenz, A. Zerneck, G. Stoll, B. Nieswandt and C. Kleinschnitz (2015). "Efficacy and Safety of Platelet Glycoprotein Receptor Blockade in Aged and Comorbid Mice With Acute Experimental Stroke." Stroke **46**(12): 3502-3506.

Li, T. T., M. L. Fan, S. X. Hou, X. Y. Li, D. M. Barry, H. Jin, S. Y. Luo, F. Kong, L. F. Lau, X. R. Dai, G. H. Zhang and L. L. Zhou (2015). "A novel snake venom-derived GPIIb/IIIa antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischaemic stroke and reperfusion injury." Br J Pharmacol **172**(15): 3904-3916.

Lourbopoulos, A., U. Mamrak, S. Roth, M. Balbi, J. Shrouder, A. Liesz, F. Hellal and N. Plesnila (2017). "Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice." J Cereb Blood Flow Metab **37**(6): 2084-2097.

Macrae, I. M. (2011). "Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia." Br J Pharmacol **164**(4): 1062-1078.

Mao, Y., M. Zhang, R. F. Tuma and S. P. Kunapuli (2010). "Deficiency of PAR4 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice." J Cereb Blood Flow Metab **30**(5): 1044-1052.

McCabe, C., M. M. Arroja, E. Reid and I. M. Macrae (2018). "Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra." Neuropharmacology **134**(Pt B): 169-177.

Meisel, C., K. Prass, J. Braun, I. Victorov, T. Wolf, D. Megow, E. Halle, H. D. Volk, U. Dirnagl and A. Meisel (2004). "Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke." Stroke **35**(1): 2-6.

Mergenthaler, P., U. Lindauer, G. A. Dienel and A. Meisel (2013). "Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function." Trends Neurosci **36**(10): 587-597.

Meschia, J. F. and T. Brott (2018). "Ischaemic stroke." Eur J Neurol **25**(1): 35-40.

Morowski, M., T. Vogtle, P. Kraft, C. Kleinschnitz, G. Stoll and B. Nieswandt (2013). "Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice." Blood **121**(24): 4938-4947.

Moskowitz, M. A., E. H. Lo and C. Iadecola (2010). "The science of stroke: mechanisms in search of treatments." Neuron **67**(2): 181-198.

Murakami, K., T. Kondo, M. Kawase and P. H. Chan (1998). "The development of a new mouse model of global ischemia: focus on the relationships between ischemia duration, anesthesia, cerebral vasculature, and neuronal injury following global ischemia in mice." Brain Res **780**(2): 304-310.

Obrenovitch, T. P. and J. M. Hallenbeck (1985). "Platelet accumulation in regions of low blood flow during the postischemic period." Stroke **16**(2): 224-234.

Panahpour, H., N. A. Terpolilli, D. Schaffert, C. Culmsee and N. Plesnila (2019). "Central Application of Aliskiren, a Renin Inhibitor, Improves Outcome After Experimental Stroke Independent of Its Blood Pressure Lowering Effect." Front Neurol **10**: 942.

Pham, M., X. Helluy, C. Kleinschnitz, P. Kraft, A. J. Bartsch, P. Jakob, B. Nieswandt, M. Bendszus and G. Stoll (2011). "Sustained reperfusion after blockade of glycoprotein-receptor-Ib in focal cerebral ischemia: an MRI study at 17.6 Tesla." PLoS One **6**(4): e18386.

Plesnila, N., S. Zinkel, D. A. Le, S. Amin-Hanjani, Y. Wu, J. Qiu, A. Chiarugi, S. S. Thomas, D. S. Kohane, S. J. Korsmeyer and M. A. Moskowitz (2001). "BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15318-15323.

Powers, W. J. (2020). "Acute Ischemic Stroke." N Engl J Med **383**(3): 252-260.

Sacco, R. L., S. E. Kasner, J. P. Broderick, L. R. Caplan, J. J. Connors, A. Culebras, M. S. Elkind, M. G. George, A. D. Hamdan, R. T. Higashida, B. L. Hoh, L. S. Janis, C. S. Kase, D. O. Kleindorfer, J. M. Lee, M. E. Moseley, E. D. Peterson, T. N. Turan, A. L. Valderrama, H. V. Vinters, C. o. C. S. American Heart Association Stroke Council, Anesthesia, R. Council on Cardiovascular, Intervention, C. Council on, N. Stroke, E. Council on, Prevention, D. Council on Peripheral Vascular, P. A. Council on Nutrition and Metabolism (2013). "An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **44**(7): 2064-2089.

Schroeter, M., S. Jander, O. W. Witte and G. Stoll (1994). "Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion." J Neuroimmunol **55**(2): 195-203.

Schuhmann, M. K., J. Guthmann, G. Stoll, B. Nieswandt, P. Kraft and C. Kleinschnitz (2017). "Blocking of platelet glycoprotein receptor Ib reduces "thrombo-inflammation" in mice with acute ischemic stroke." J Neuroinflammation **14**(1): 18.

Schuhmann, M. K., P. Kraft, M. Bieber, A. Haarmann, G. A. Homola, M. Pham, B. Nieswandt and G. Stoll (2018). "Influence of Thrombolysis on the Safety and Efficacy of Blocking Platelet Adhesion or Secretory Activity in Acute Ischemic Stroke in Mice." Transl Stroke Res **9**(5): 493-498.

Silva, G. S. and R. G. Nogueira (2020). "Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke." Continuum (Minneapolis) **26**(2): 310-331.

- Sommer, C. J. (2017). "Ischemic stroke: experimental models and reality." Acta Neuropathol **133**(2): 245-261.
- Stegner, D., C. Deppermann, P. Kraft, M. Morowski, C. Kleinschnitz, G. Stoll and B. Nieswandt (2013). "Munc13-4-mediated secretion is essential for infarct progression but not intracranial hemostasis in acute stroke." J Thromb Haemost **11**(7): 1430-1433.
- Stegner, D., V. Klaus and B. Nieswandt (2019). "Platelets as Modulators of Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury." Front Immunol **10**: 2505.
- Stoll, G., S. Jander and M. Schroeter (1998). "Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions." Prog Neurobiol **56**(2): 149-171.
- Stoll, G., C. Kleinschnitz and B. Nieswandt (2010). "Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke?" Ann N Y Acad Sci **1207**: 149-154.
- Tajiri, N., T. Dailey, C. Metcalf, Y. I. Mosley, T. Lau, M. Staples, H. van Loveren, S. U. Kim, T. Yamashima, T. Yasuhara, I. Date, Y. Kaneko and C. V. Borlongan (2013). "In vivo animal stroke models: a rationale for rodent and non-human primate models." Transl Stroke Res **4**(3): 308-321.
- Thal, S. C. and N. Plesnila (2007). "Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice." J Neurosci Methods **159**(2): 261-267.
- Virani, S. S., A. Alonso, E. J. Benjamin, M. S. Bittencourt, C. W. Callaway, A. P. Carson, A. M. Chamberlain, A. R. Chang, S. Cheng, F. N. Delling, L. Djousse, M. S. V. Elkind, J. F. Ferguson, M. Fornage, S. S. Khan, B. M. Kissela, K. L. Knutson, T. W. Kwan, D. T. Lackland, T. T. Lewis, J. H. Lichtman, C. T. Longenecker, M. S. Loop, P. L. Lutsey, S. S. Martin, K. Matsushita, A. E. Moran, M. E. Mussolino, A. M. Perak, W. D. Rosamond, G. A. Roth, U. K. A. Sampson, G. M. Satou, E. B. Schroeder, S. H. Shah, C. M. Shay, N. L. Spartano, A. Stokes, D. L. Tirschwell, L. B. VanWagner, C. W. Tsao, E. American Heart Association Council on, C. Prevention Statistics and S. Stroke Statistics (2020). "Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association." Circulation **141**(9): e139-e596.
- Wafa, H. A., C. D. A. Wolfe, E. Emmett, G. A. Roth, C. O. Johnson and Y. Wang (2020). "Burden of Stroke in Europe: Thirty-Year Projections of Incidence, Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life Years." Stroke **51**(8): 2418-2427.
- Yamauchi, K., T. Imai, M. Shimazawa, T. Iwama and H. Hara (2017). "Effects of ticagrelor in a mouse model of ischemic stroke." Sci Rep **7**(1): 12088.
- Zerna, C., J. Hegedus and M. D. Hill (2016). "Evolving Treatments for Acute Ischemic Stroke." Circ Res **118**(9): 1425-1442.




7. Danksagung

Ich möchte mich zuallererst ganz herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila für die Überlassung des Themas, die willkommene Aufnahme in die Arbeitsgruppe und seine exzellente Betreuung. Außerdem gilt mein Dank Dr. med. Nicole Terpolilli für die ausgezeichnete Hilfestellung und Unterstützung während des gesamten Projekts. Frau Uta Mamrak danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die Methoden und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Auch möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen der AG Plesnila und des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung für den wissenschaftlichen Austausch und das angenehme Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Thi Nga Tran und Chi Thanh Tran und meinem Bruder , die mich stets unterstützt und motiviert haben.

8. Eidesstattliche Erklärung

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Tran, Chi Dat

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Therapeutische Depletion von Thrombozyten nach experimentellem Schlaganfall

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hannover, der 29.11.2022

Ort, Datum

Tran, Chi Dat

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand