

Aus der Klinik für Neurologie,
Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Präventive Antibiotikatherapie im Vergleich zur Standardtherapie des akuten
ischämischen Schlaganfalls in einem präklinischen Modell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Susann Hetze
aus Halle

Datum der Promotion: 26.02.2016

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>III</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>VI</u>
<u>1 ABSTRACT</u>	<u>1</u>
1.1 DEUTSCH	1
1.2 ENGLISCH	2
<u>2 EINLEITUNG</u>	<u>4</u>
2.1 SOZIOÖKONOMISCHE BEDEUTUNG DES SCHLAGANFALLS	4
2.2 SCHLAGANFALL ASSOZIIERTE KOMPLIKATIONEN	5
2.2.1 ALLGEMEINE KOMPLIKATIONEN	5
2.2.2 INFEKTIONEN ALS FOLGE DES SCHLAGANFALLS	6
2.3 AKTUELLE THERAPIESTANDARDS ZUR BEHANDLUNG DES AKUTEN ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	10
2.4 HINTERGRUND DER EXPERIMENTELLEN STUDIE	11
2.5 ARBEITSHYPOTHESEN	13
<u>3 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>14</u>
3.1 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MATERIALIEN UND PROGRAMME	14
3.2 VERABREICHUNG DER VERWENDETEN PHARMAKA	17
3.3 VERSUCHSTIERE UND UNTERBRINGUNG	17
3.4 STUDIENDESIGN	18
3.5 DAS SCHLAGANFALLMODELL DER MAUS	19
3.6 INFARKTVOLUMETRIE	21
3.7 IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN	22
3.7.1 ORGANENTNAHME	22
3.7.2 AUFREINIGUNG MONONUKLEARER ZELLEN AUS DEM GEHIRN	22
3.7.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	23
3.8 NEU ENTWICKELTE METHODEN	24
3.8.1 GANGANALYSE ALS VERFAHREN ZUR ERHEBUNG NEUROLOGISCHER PARAMETER	24
3.8.1.1 Hintergrund	24
3.8.1.2 Experimenteller Aufbau	25
3.8.1.3 Erhobene Gangparameter	27

3.8.2	DIE MRT ALS DIAGNOSTIKMETHODE DER PNEUMONIE	30
3.8.2.1	Experimenteller Versuchsaufbau	30
3.8.2.2	Untersuchung der bakteriellen Besiedelung der Lunge	31
3.8.3	ALLGEMEINER GESUNDHEITSSCORE DER MAUS	32
3.9	STATISTISCHE ANALYSE	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	NEUE METHODEN	34
4.1.1	DIE GANGANALYSE ALS GEEIGNETES MESSVERFAHREN FÜR NEUROLOGISCHE PARAMETER	34
4.1.1.1	Schlaganfallsensitive Parameter	34
4.1.1.2	Infarkt volumen	39
4.1.1.3	Analyse der Anwendbarkeit	39
4.1.2	DIE MRT ALS NEUE METHODE FÜR DIE DIAGNOSE EINER PNEUMONIE IM MAUSMODELL	42
4.2	EFFEKTE EINER PRÄVENTIVEN ANTIBIOTIKATHERAPIE AUF VERSCHIEDENE PARAMETER IM MAUSMODELL DES SCHLAGANFALLS	43
4.2.1	ANALYSE DER LETALITÄTSRATE	43
4.2.2	HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER PNEUMONIE	44
4.2.3	OBJEKTIVIERBARE GESUNDHEITSPARAMETER IM VERLAUF	45
4.2.4	KORRELATION ZWISCHEN DEM GESUNDHEITSSCORE UND DEN MRT-RESULTATEN	46
4.2.5	AUSWERTUNG DER NEUROLOGISCHEN PARAMETER	47
4.2.6	IMMUNHISTOLOGISCHE ERGEBNISSE	48
5	DISKUSSION	50
5.1	ETABLIERUNG NEUER METHODEN	50
5.1.1	DIE GANGANALYSE ALS ZUVERLÄSSIGES MESSVERFAHREN NEUROLOGISCHER DEFIZITE	50
5.1.2	MRT ALS GEEIGNETE METHODE ZUR DIAGNOSE EINER PNEUMONIE	54
5.2	DIE PRÄVENTIVE ANTIBIOTIKATHERAPIE IM VERGLEICH ZUR STANDARDTHERAPIE DES ISCHÄMISCHEN SCHLAGANFALLS	55
5.3	AUSBLICK	59
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
<hr/>		
LITERATURVERZEICHNIS		VI
<hr/>		
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		XIV
<hr/>		
ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN		XV
<hr/>		
CURRICULUM VITAE		XVI
<hr/>		
PUBLIKATIONEN		XVII
<hr/>		
DANKSAGUNG		XVIII
<hr/>		

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i> ; Arterie
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
aff.	afferent
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
Ca ²⁺	Calcium
CFU	<i>colony-forming unit</i> ; koloniebildende Einheit
Cl ⁻	Chlorid (Ionen)
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
d.h.	das heißt
diag.	diagonal
eff.	efferent
etc.	et cetera
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; Fötales Bovines Serum
FOV	<i>field of view</i> ; Sichtfeld bzw. Bildfeld (MRT)
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
IFN	Interferon
IL	Interleukin
insg.	insgesamt
K ⁺	Kalium (Ionen)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
lat.	lateral
LCCA	<i>left common carotic artery</i> ; <i>A. carotis comm. sinistra</i>
LECA	<i>left external carotic artery</i> ; <i>A. carotis externa sinistra</i>
LF	<i>left front paw</i> ; linke Vorderpfote
LH	<i>left hind paw</i> ; linke Hinterpfote
LICA	<i>left internal carotic artery</i> ; <i>A. carotis interna sinistra</i>
LMCA	<i>left middle cerebral artery</i> ; <i>A. cerebri media</i>

MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> ; operativer Verschluss der <i>A. cerebri media</i>
MGHS	<i>mouse general health score</i> ; allgemeiner Gesundheitsscore der Maus
mg	Milligramm
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex Typ 2
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobengröße
N.	<i>Nervus</i> ; Nerv
Na ⁺	Natrium (Ionen)
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
o.	oder
PAT	präventive Antibiotikatherapie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PNS	parasympathisches Nervensystem
RF	<i>right front paw</i> ; rechte Vorderpfote
RH	<i>right hind paw</i> ; rechte Hinterpfote
rt-PA	<i>recombinant tissue-type plasminogen activator</i> ; Alteplase
s.c.	<i>subcutan</i>
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SE	<i>standard error</i> ; Standardfehler
SIIDS	schlaganfallinduziertes Immundepressionssyndrom
SNS	sympathisches Nervensystem
sog.	sogenannt
SOP	Standard-Operationsprozedur
s.u.	siehe unten
TE	<i>echo time</i> ; Echozeit (MRT)
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	<i>repetition time</i> ; Repetitionszeit (MRT)
u.	und
ZNS	Zentrales Nervensystem
zw.	zwischen
µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Häufigkeitsverteilung symptomatischer Komplikationen nach Schlaganfall	5
Tab. 2:	Übersicht verwendeter Substanzen und Pharmaka	14
Tab. 3:	Auflistung der verwendeten Materialien und Laborgeräte	15
Tab. 4:	Übersicht der verwendeten Programme und ihre jeweilige Anwendung	16
Tab. 5:	Darstellung des Bederson Scores	21
Tab. 6:	Übersicht der verwendeten Fluoreszenzmarker	24
Tab. 7:	Übersicht der wichtigsten Gangparameter mit Erläuterung	29
Tab. 8:	Allgemeiner Gesundheitsscore der Maus	32
Tab. 9:	Übersicht schlaganfallsensitiver Gangparameter	38
Tab. 10:	Beispielkalkulation zum Effektgrößenvergleich	41
Tab. 11:	Anzahl der verschiedenen ZNS infiltrierenden Zellpopulationen	49
Tab. 12:	Korrelationsmatrix zw. funktionellem und immunologischem Ergebnis	49

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem	7
Abb. 2:	Schema pathophysiologischer Mechanismen in Folge des SIIDS	9
Abb. 3:	Experimentelles Studiendesign	18
Abb. 4:	Beispiel eines Operationssitus der MCAO mit schematischer Darstellung	20
Abb. 5:	Darstellung des CatWalk™ Ganganalysesystems	26
Abb. 6:	Grafische Darstellung ausgewählter Gangparameter	27
Abb. 7:	Grafische Darstellung und Berechnung der Phasendispersion	28
Abb. 8:	Abbildung des 7-Tesla-Kleintier Kernspintomographen	30
Abb. 9:	Laufdauer und maximale Kontaktfläche nach der MCAO	35
Abb. 10:	Normalisierte Schwenkgeschwindigkeit und Schrittlänge nach MCAO	36
Abb. 11:	Signifikant verringerter Regularitätsindex nach Schlaganfall	36
Abb. 12:	Phasendispersion der diagonalen Gliederpaare und des Beckengürtelpaares	37
Abb. 13:	Charakteristische T2-gewichtete MRT-Bildgebung eines Mausgehirns	39
Abb. 14:	T1-gewichtete MRT-Sequenz der Lunge einer erkrankten Maus	42
Abb. 15:	Korrelation zwischen Goldstandard und MRT zur Pneumoniediagnostik	43
Abb. 16:	Kaplan Meier Analyse der Überlebensrate aller Behandlungsgruppen	44
Abb. 17:	Lungeninfektionsrate der PAT und Standardbehandlung im Vergleich	44
Abb. 18:	MGHS im Verlauf des Experiments	45
Abb. 19:	Das Körpergewicht der Versuchstiere im Verlauf	46
Abb. 20:	Signifikante Unterschiede der neurologischen Ergebnisse	48
Abb. 21:	Korrelation zwischen funktionellen und immunologischen Ergebnissen	50

1 Abstract

1.1 Deutsch

Schlaganfallpatienten sind gegenüber lebensbedrohlichen Infektionen, insbesondere für bakterielle Lungenentzündungen, anfällig. Experimentelle Schlaganfallstudien haben gezeigt, dass eine präventive Behandlung mit Antibiotika (PAT) das Ergebnis, im Vergleich zu einer Placebobehandlung, verbessern kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine PAT auch dem aktuellen klinischen Goldstandard für die Behandlung von schlaganfallassoziierten Infektionen im Mausmodell überlegen ist. Es wurde daher die Schlaganfallversorgung gemäß aktueller Leitlinien, die erst nach der Diagnose einer Infektion eine antibiotische Behandlung empfiehlt, in ein experimentelles Mausmodell transferiert. Diese Standardtherapie wurde mit der PAT verglichen. Um eine Pneumonie an lebenden Mäusen diagnostizieren zu können, wurde der allgemeine Gesundheitsscore (MGHS) und ein MRT-Protokoll zur Erhebung des bildmorphologischen Korrelats etabliert.

Ein weiteres wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zur Beurteilung des funktionellen Ergebnisses zu etablieren. Die Verminderung schlaganfallbedingter neurologischer Defizite ist ein zentraler Bestandteil des klinischen Therapiekonzepts. Präklinische Studien, wie tierexperimentelle Schlaganfallmodelle, können hier zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien und vorhersagekräftiger tierexperimenteller Schlaganfallmodelle beitragen. Die Messung des Langzeitergebnisses, insbesondere in Mausmodellen des Schlaganfalls, ist eine der Hauptlimitationen in der experimentellen Schlaganfallforschung. Die Beurteilung neurologischer Defizite im Tiermodell ist jedoch von entscheidender Bedeutung, um die Aussagekraft der präklinischen Ergebnisse zu verbessern.

Die untersuchte automatisierte Ganganalyse stellt eine sensitive Methode dar, um die Lokomotion und Koordination zu überprüfen. 10 Tage nach Induktion des experimentellen Schlaganfalls (MCAO) zeigten sich signifikante Veränderungen verschiedener Gangparameter, wie der maximalen Kontaktfläche der Pfoten zum Boden, Schrittlänge und Schwenkgeschwindigkeit der Hinterpfoten, insbesondere kontralateral zum Schlaganfall. Die Mäuse wiesen eine beeinträchtigte Koordination zwischen den einzelnen Pfoten auf, die sich in einem verschlechterten Regularitätsindex und einer veränderten Phasendispersion widerspiegelten. Für die Beurteilung, ob die Ganganalyse ein geeignetes Verfahren zur Detektion eines verbesserten neurologischen Outcomes ist, beispielsweise durch die Gabe neuroprotektiver Substanzen, wurde eine Modellrechnung angewendet und generelle statistische

Probleme diskutiert. Mithilfe dieser neuen Methoden konnte gezeigt werden, dass die PAT nicht nur eine Pneumonie wirksam verhinderte, sondern auch das allgemeine medizinische Ergebnis im Vergleich zu der Standardbehandlung verbesserte.

Sowohl die PAT als auch die Standardtherapie mit Enrofloxacin verbesserte die Überlebensrate gegenüber dem Placebo (NaCl) signifikant, jedoch konnte nur die PAT zusätzlich neurologische Defizite relevant verringern. Im experimentellen Schlaganfallmodell der Maus ist die PAT der Standardtherapie hinsichtlich des funktionellen Ergebnisses und der Infektionsprophylaxe überlegen. Unter Berücksichtigung einer aktuell negativen klinischen Studie (PASS) sollte das Therapieprinzip jedoch weiterhin im Rahmen klinischer Studien bei Hochrisiko-Patienten geprüft werden.

1.2 Englisch

Stroke patients are prone to life-threatening infections, especially bacterial pneumonia. Previous experimental stroke studies have demonstrated, that preventive antibiotic treatment (PAT) improves outcome compared with placebo treatment. This study investigates whether PAT is superior to the current clinical ‘gold standard’ for treating post-stroke infections. Therefore stroke care according to the current stroke guidelines, recommending early antibiotic treatment after diagnosing infections, was modeled in an experimental setting. To reliably diagnose pneumonia in living mice, a general health score and a magnetic resonance imaging protocol for radiologic confirmation was established. Another important aim of this study was to establish a method for assessing functional outcome. Ameliorating stroke induced neurological deficits is also one of the most important goals of stroke therapy. In order to improve stroke outcome, novel treatment approaches as well as animal stroke models predictive for the clinical setting are of urgent need. Measuring long-term outcome, in particular in mouse models of stroke, is one of the main obstacles in experimental stroke research, but it should be kept in mind that assessing functional deficits in animal models of stroke is critical to improve the prediction of preclinical findings.

Automated gait analysis provides a sensitive tool to examine locomotion and limb coordination in small rodents. Comparing mice before and 10 days after experimental stroke (MCAO) we observed a significant decrease in several gait parameters: maximum contact area, stride length and swing speed in the hind limbs, especially the contralateral one. Mice showed a disturbed interlimb coordination represented by changes in regularity index and phase dispersion. To

assess whether gait analysis is applicable to assess improvements by neuroprotective compounds, a model calculation was applied and common statistical problems were approached. Compared with standard treatment after diagnosis by these methods, PAT not only abolished pneumonia successfully but also improved general medical outcome.

Both, preventive and standard antibiotic treatment using enrofloxacin improved survival in a similar way compared with placebo treatment. However, in contrast to standard treatment only PAT improved functional outcome assessed by gait analysis. In conclusion, standard and preventive treatment approach reduced post-stroke mortality, however at the cost of a worse neurologic outcome compared with preventive approach. Considering a current negative clinical study (PASS) the therapeutic principle should be taken in account within the context of other clinical studies concerning high-risk patients.

2 Einleitung

2.1 Sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls

Der Schlaganfall stellt neben kardiovaskulären und neoplastischen Erkrankungen einer der häufigsten Todesursachen weltweit dar (Di Carlo 2009). Er manifestiert sich als fokales neurologisches Defizit aufgrund komplexer pathophysiologischer Mechanismen, die durch eine plötzliche Unterbrechung der zerebralen Durchblutung heterogener Pathogenese verursacht werden (Moskowitz et al. 2010; Dirnagl et al. 1999). Jährlich erleiden weltweit 16 Millionen Menschen einen Schlaganfall, davon versterben 5,7 Millionen an dem Schlaganfall oder an den Folgen (Strong et al. 2007). Die Überlebenden leiden nicht selten an bleibenden physischen oder kognitiven Beeinträchtigungen. Bei ungefähr 40% der Patienten bleiben motorische, kognitive Funktionsbeeinträchtigungen nach dem Schlaganfall bestehen (Young & Forster 2007). Die Folgen des Schlaganfalls sind eine der häufigsten Ursachen für Behinderungen im Erwachsenenalter und bedeuten einen starken Einschnitt in die bisherige Lebensqualität der Patienten und des familiären Umfeldes. Insbesondere bei älteren Schlaganfallpatienten (> 65 Jahre) wurden funktionelle Beeinträchtigungen, wie Hemiparesen (~50%), Gangstörungen (~30%) und Aphasien (~19%), noch in einem Zeitraum von sechs Monaten nach Eintritt des Schlaganfalls beobachtet (Kelly-Hayes et al. 2003). Mehr als 30% der älteren Patienten müssen aufgrund von schlaganfallbedingten Behinderungen in Pflegeheimen untergebracht werden, um die notwendige Unterstützung bei den Aktivitäten des täglichen Lebens zu gewährleisten (Kelly-Hayes et al. 2003). Neben den auftretenden physischen und psychischen Belastungen der Betroffenen führt der Schlaganfall auch zu einer jährlichen volkswirtschaftlichen Belastung von ungefähr 65,5 Milliarden Dollar in den USA (Rosamond et al. 2008) und ca. 27 Milliarden Euro in Europa (Lloyd-Jones et al. 2009). Aufgrund der allgemein steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung und der damit verbundenen steigenden Anzahl von Schlaganfallereignissen sind die Prävention sowie die Verbesserung von Therapieansätzen des Schlaganfalls auch in Zukunft von großer Bedeutung, um die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern und sozioökonomische Belastungen zu verringern.

2.2 Schlaganfall assoziierte Komplikationen

2.2.1 Allgemeine Komplikationen

In den ersten drei Monaten nach Eintritt eines Schlaganfalls haben bis zu 95% der Patienten medizinische Komplikationen, die einen direkten Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf nehmen (Johnston et al. 1998). Die Wahrscheinlichkeit an internistischen und neurologischen Begleiterkrankungen zu versterben, steigt durch Komplikationen um ca. 50% (Heuschmann et al. 2004). Ein erhöhter intrakranieller Druck (7,6%) sowie das Auftreten eines erneuten Schlaganfalls (5,1%) sind die häufigsten Ursachen einer weiteren Gesundheitsverschlechterung der Patienten (Weimar et al. 2002; Heuschmann et al. 2004). Des Weiteren sind Stürze (durch funktionelle Gangdefizite), Dekubiti, Thrombosen, Schmerzen und Depressionen ernst zu nehmende Komplikationen innerhalb der ersten Monate nach einem Schlaganfall (Davenport et al. 1996; Langhorne et al. 2000). In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten symptomatischen Komplikationen und deren prozentuale Häufigkeit bei Schlaganfallpatienten aufgeführt.

Komplikation	Häufigkeit
<i>Neurologische Komplikationen</i>	
Erneuter Schlaganfall	5,1 - 12%
Erhöhter intrakranieller Druck	7,6%
Epileptischer Anfall	1 - 5%
<i>Infektiologische Komplikationen</i>	
Harnwegsinfektion	18 - 28%
Pneumonie	18 - 27%
Andere	15 - 24%
<i>Internistische Komplikationen</i>	
Tiefe Beinvenenthrombose	0 - 3%
Lungenembolie	0 - 2%
Arterielle Hypertension	7,5%
Fieber (> 38,5° C)	13,2%
<i>Psychologische Komplikationen</i>	
Depression	12 - 21%
Verwirrheitszustände	30 - 41%
Angstzustände	10 - 18%
<i>Mobilität und andere Komplikationen</i>	
Sturz mit Verletzung	2 - 7%
Dekubitus	16 - 25%
Schmerzen	28 - 39%

Tabelle 1 | Übersicht der durchschnittlichen Häufigkeitsverteilung symptomatischer Komplikationen nach einem Schlaganfall. Die Daten stammen aus zwei Multicenter Studien mit insgesamt 6723 Patienten (Langhorne et al. 2000; Weimar et al. 2002).

Infektiologische Komplikationen treten bei einem Drittel der Schlaganfallpatienten auf und stellen in Bezug auf die Mortalität einen wesentlichen Risikofaktor dar (Emsley & Hopkins 2008). Die Inzidenz nosokomialer Infektionen ist nach einem akuten Schlaganfall mit bis zu 50% signifikant höher als nach sonstigen internistischen oder neurologischen Erkrankungen, bei denen die Inzidenz bei 7 - 10% liegt (Meisel et al. 2005). Eine Dysphagie und der Schweregrad des Schlaganfalls stellen wichtige Prädiktoren für eine Infektion dar, jedoch erklären diese allein nicht die Infektionsanfälligkeit der Patienten (Weimar et al. 2002).

2.2.2 Infektionen als Folge des Schlaganfalls

Klinische Beobachtungen führen zu der Frage, weshalb nach Ischämien oder Traumata des Gehirns häufig nosokomiale Infektionen auftreten. Aspirationen sowie katheterassoziierte Infektionen wurden lange als mögliche Ursachen diskutiert. Da jedoch ca. 50% der gesunden Erwachsenen im normalen Nachtschlaf aspirieren, ohne an einer Pneumonie zu erkranken, scheint speziell bei Schlaganfallpatienten, auch im Vergleich zu chirurgischen oder internistischen Patienten, eine andere Ursache für die hohe Rate an Infektionen zugrunde zu liegen (Marik 2001; Perry & Love 2001). Bei Patienten mit Infarkten, die zu keinen beobachtbaren funktionellen Defiziten führten (sog. stille Infarkte), zeigte sich ebenfalls eine höhere Inzidenz für Infektionen des Respirationstraktes (Nakagawa et al. 2000). Verschiedene Studien untersuchten diesen Zusammenhang: Es zeigte sich, dass ein Infarkt oder eine traumatische Verletzung des Gehirns eine Störung des Gleichgewichts zwischen Immun- und dem zentralen Nervensystem zur Folge hat (Klehm et al. 2009; Meisel et al. 2005).

Immun- und Nervensystem sind durch eine bidirektionale Kommunikation miteinander verbunden und stellen ein physiologisches Gleichgewicht zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Kaskaden her. Neben den autoregulatorischen Mechanismen des Immunsystems stellt das zentrale Nervensystem einen wichtigen antiinflammatorischen Gegenspieler dar (Abb. 1a). In einem gesunden Organismus werden bei Verletzungen oder Infektionen proinflammatorische Zytokine vom Immunsystem sezerniert. Hierunter zählen beispielsweise Interleukine (IL), Interferone (IFN), Lipidmediatoren sowie der Tumornekrosefaktor (TNF). Die proinflammatorische Immunantwort kann in besonders schweren Fällen, wie bei einer Sepsis, zu einer überschießenden Entzündungsreaktion führen. Hierbei ist die Balance der verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren gestört (Abb. 1b). In der Folge kann es zu systemischen Auswirkungen, wie einem septischen Schock kommen.

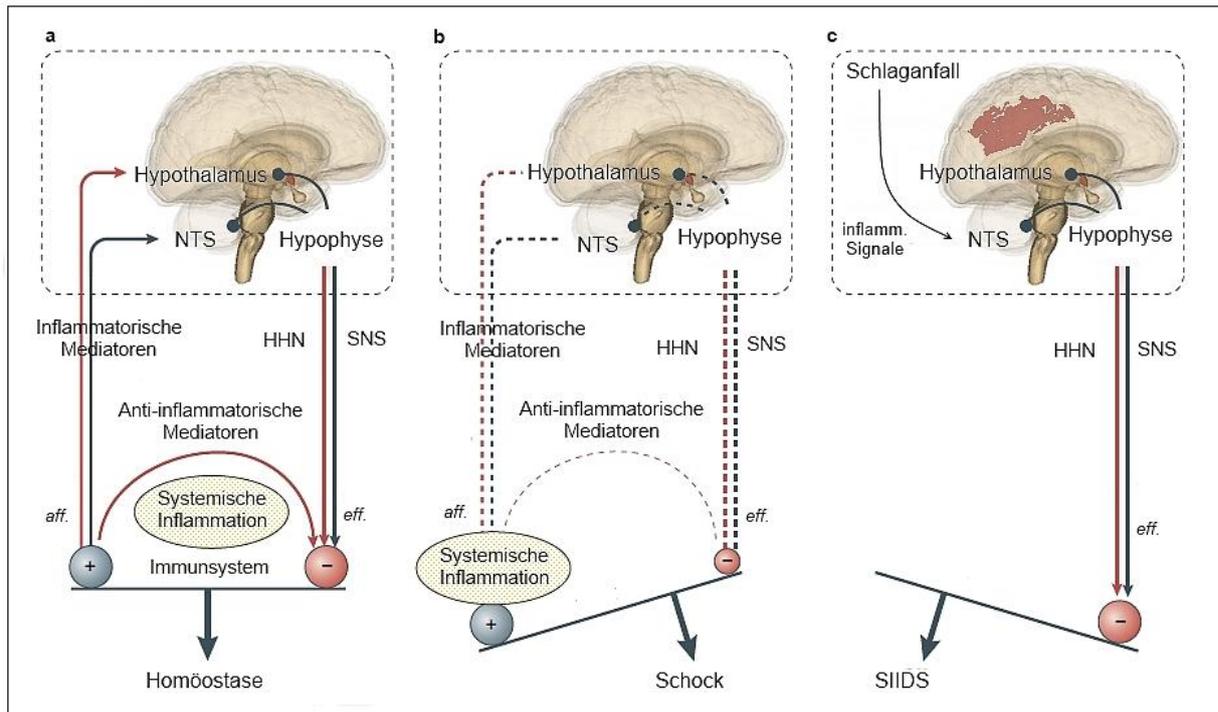


Abb. 1 | Schematische Darstellung der Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem. **a** | Die bidirektionale Kommunikation ermöglicht die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen inflammatorischen und anti-inflammatorischen Kaskaden. **b** | Die Homöostase kann durch eine überschießende systemische Immunreaktion (bspw. Sepsis) empfindlich gestört werden und zum Schock oder Tod führen. **c** | Eine isolierte Inflammation des ZNS nach Schlaganfall ohne die Anwesenheit einer systemischen Infektion kann zu einer aktiven Unterdrückung der peripheren Immunität führen - dem sog. schlaganfallinduzierten Immundepressionssyndrom (SIIDS; Abbildung nach Meisel et al. 2005).

Wird der antiinflammatorische Einfluss des ZNS in Abwesenheit einer systemischen Infektion aktiv, kann eine für den Organismus ebenfalls nachteilige Immunsituation entstehen. Mit einer zerebralen Ischämie oder Trauma geht häufig eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch komplexe pathophysiologische Mechanismen einher (Dirnagl et al. 1999). Aufgrund des plötzlichen Verschlusses einer hirnersorgenden Arterie kommt es bei einem ischämischen Schlaganfall zu einer Unterversorgung der Hirnstrukturen mit wichtigen Substraten wie Glucose und Sauerstoff (Martin et al. 1994). Durch dieses Defizit können physiologische Stoffwechselabläufe nicht aufrecht erhalten werden, dies führt unter anderem zu einer Depolarisation der Membrane von Neuronen und Gliazellen (Katsura et al. 1994). Als Folge dieser Spannungsänderung werden exzitatorische Transmitter über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in den Extrazellularraum sezerniert, welche sich durch eine fehlende Wiederaufnahme anreichern. Insbesondere durch die Akkumulation von Glutamat kommt es durch die Aktivierung von NMDA- oder auch Glutamat Rezeptoren zu einem Ca^{2+} -Überschuss,

wodurch ein Einstrom von Na^+ und Cl^- , beispielsweise über eine Aktivierung von AMPA-Rezeptor-Kanälen, in die Nervenzellen bedingt wird (Dirnagl et al. 1999). Aufgrund des daraus resultierenden passiven Einstroms von Wasser in die Zellen entsteht ein Ödem, das das Hirnparenchym durch eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes und zunehmende vaskuläre Kompression weiter schädigen kann. Die entstandene Hypoxie, freie Sauerstoffradikale und der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel im Extrazellulärraum führen zu einer erhöhten Sezernierung von Inflammediatoren, wie TNF α (Gong et al. 1998), *platelet-derived*-Faktor (Lindsberg et al. 1991) und Interleukinen (IL-1 β ; Zhang et al. 1998) der geschädigten Hirnzellen (Rothwell & Hopkins 1995). Des Weiteren wird die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induziert (R. Zhang et al. 1998; Lindsberg et al. 1996; Haring et al. 1996), worüber eine Interaktion mit den komplementären Oberflächenrezeptoren von neutrophilen Zellen ermöglicht wird. Die Neutrophilen und andere Bestandteile der adaptiven Immunabwehr wandern nun aufgrund der beeinträchtigten physiologischen Funktion der Blut-Hirn-Schranke über die Gefäßwand der hirnversorgenden Gefäße in das Parenchym ein, wo sie sich im Verlauf akkumulieren und eine autoaggressive Reaktion hervorrufen können (Gelderblom et al. 2009; Iadecola & Anrather 2011). Es zeigte sich, dass diese Mechanismen eine weitere Schädigung der Hirnstrukturen nach dem Schlaganfall begünstigen (Akopov et al. 1996). Eine systemische Inhibition des Immunsystems durch zentral gesteuerte Mechanismen würde vor einer solchen Autoaggression schützen und einer weiteren Schädigung des Gehirngewebes entgegenwirken. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass sich bei B- und T-Lymphozyten defizienten Mäusen die Inflammation als auch die Läsionsgröße reduzierte (Hurn et al. 2007).

Die durch den Schlaganfall induzierte lokale Diffusion proinflammatorischer Zytokine in das Hirnparenchym löst im nächsten Schritt eine zentrale antiinflammatorische Antwort aus (Woiciechowsky et al. 2002; Kossmann et al. 1995). Bei einer nicht vorhandenen systemischen Infektion führt eine Inflammation des ZNS nach einer traumatischen Läsion zu einer aktiven Unterdrückung der peripheren Immunität, dem schlaganfallinduzierten Immundepressions-syndrom (SIIDS; Abb. 1c; Meisel et al. 2005). Wird dieser Vorgang nach einer Schädigung des Hirnparenchyms durch lokale Diffusion inflammatorischer Zytokine forciert, kann sich diese antiinflammatorische Antwort in einer deutlich erhöhten Suszeptibilität des Organismus gegenüber Infektionen widerspiegeln (Prass et al. 2003). Das Infektionsrisiko steigt zudem durch die Hospitalisierung und durch funktionelle Dysfunktionen, wie beispielsweise Dysphagien, Aspirationen, Blasenentleerungsstörungen und Immobilität (Meisel et al. 2005). Systemische Infektionen erhöhen die Mortalitätsrate und verschlechtern das funktionelle Ergebnis der

Patienten (Davenport et al. 1996; Johnston et al. 1998; Katzan et al. 2003). Die beschriebenen Mechanismen sind unter der Abbildung 2 vereinfacht zusammengefasst.

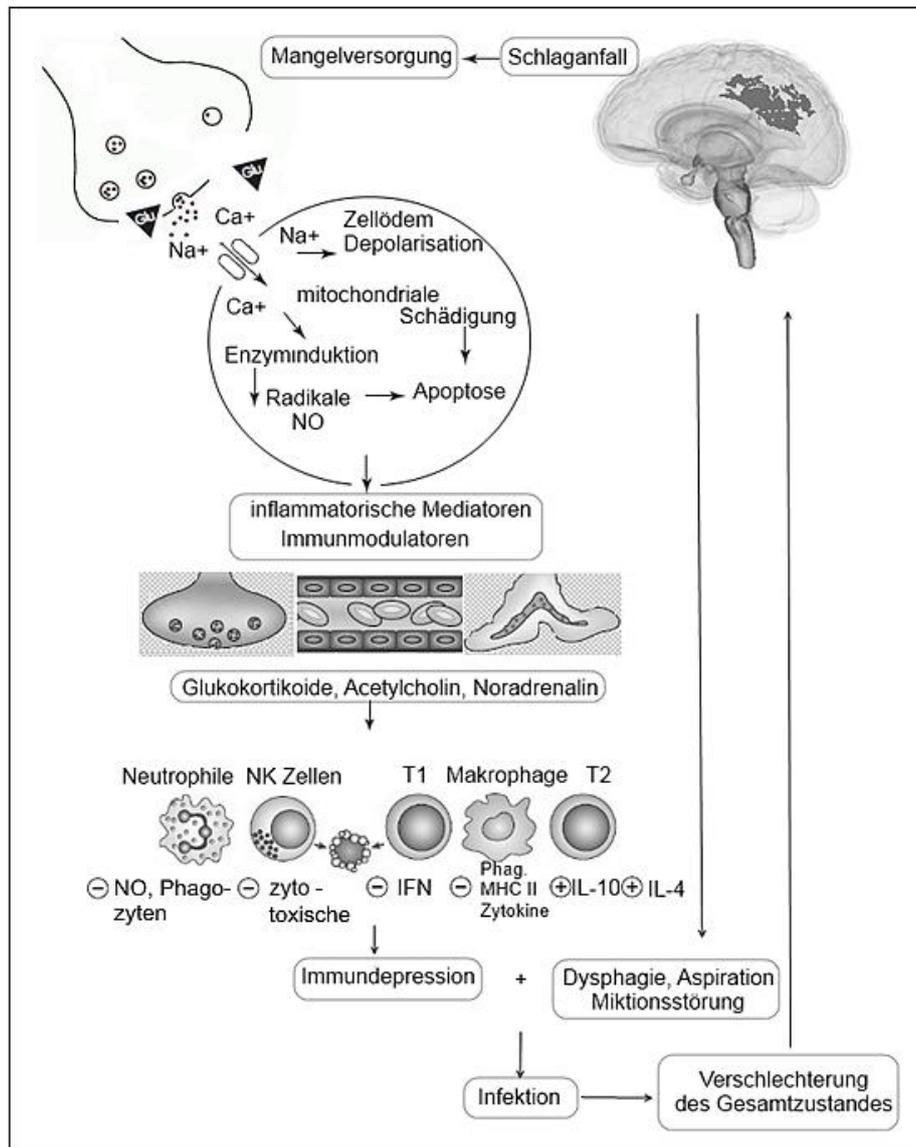


Abb. 2 | Schematische Zusammenfassung pathophysiologischer Mechanismen nach einem Schlaganfall und Erläuterung des SIIDS. Die veränderte Stoffwechselsituation im Infarktareal führt zu einer lokalen Sezernierung immunmodulatorischer Transmitter. Die im Verlauf induzierte Immundepression sowie funktionelle Defizite führen zu einer gesteigerten Suszeptibilität des Organismus für Infektionen. Die resultierende Verschlechterung des Allgemeinzustandes erhöht die Mortalität und beeinträchtigt die Regeneration des geschädigten Hirnparenchyms (Legende: NO - Stickstoffmonoxid, IFN - Interferon γ , IL - Interleukin, MHC II - *Major Histocompatibility Complex* Typ 2, NK - natürliche Killerzellen, Phag. - Phagozyten. Abbildung nach Dirnagl et al. 1999 und Meisel et al. 2005).

Ungeklärt ist, ob das ZNS möglicherweise "erlernt" hat, sich durch eine zentrale Inhibition der peripheren Immunität vor einer Infiltration peripherer Immunzellen zu schützen (Abb. 1c). Es gibt nach aktueller Studienlage keine ausreichenden Daten zur Klärung der Frage, ob durch das Auftreten des SIIIDS das neurologische Langzeitergebnis von Schlaganfallpatienten verbessert oder durch die Schwächung der Immunität verschlechtert wird.

2.3 Aktuelle Therapiestandards zur Behandlung des akuten ischämischen Schlaganfalls

Die aktuellen Therapiestandards des akuten ischämischen Insultes haben das Ziel, die endgültige Läsionsgröße und die daraus resultierenden neurologischen Defizite so gering wie möglich zu halten. Nach dem Konzept "*time is brain*" wird eine zügige klinische Versorgung des Patienten angestrebt. Dabei kann eine relative Risikosenkung der Mortalität um bis zu 18 - 46% erreicht werden, wenn eine interdisziplinäre Behandlung in Kliniken mit einer spezialisierten Schlaganfallstation (*Stroke Units*) erfolgt (DGN 2014). Die Vorteile liegen hier in der Möglichkeit eine sofortige apparative Diagnostik, wie beispielsweise eine kraniale Computertomografie, Magnetresonanztomografie, digitale Subtraktionsangiografie oder Neurosonografie durchführen zu können. Die medizinische Behandlung von Schlaganfallpatienten setzt sich im Wesentlichen aus fünf wichtigen Komponenten zusammen. Hierzu zählt die Überwachung vitaler Parameter, ggf. eine rekanalisierende Therapie, die Vorbeugung von Komplikationen (bspw. durch Frühmobilisation und Thromboseprophylaxe), eine Sekundärprophylaxe, als auch das Einleiten frühzeitiger rehabilitativer Maßnahmen (DGN 2014). Mit der Aufrechterhaltung physiologischer Parameter durch kardiopulmonale Therapieoptionen, den Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes sowie der Blutzucker- und Körpertemperaturüberwachung wird eine Schlaganfallbasistherapie gewährleistet.

Innerhalb eines 4,5-Stunden-Zeitfensters wird die rekanalisierende Therapie mit Alteplase (*recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA*) zur Behandlung eines ischämischen Hirninfarktes empfohlen, unter der Voraussetzung, dass ein hämorrhagischer Insult ausgeschlossen werden kann (Lees et al. 2010; Hacke et al. 2008). Zur Verminderung von Rezidiven kann eine frühe Sekundärprophylaxe mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure mit 100 - 300 mg/d eingeleitet werden, jedoch nicht in den ersten 24 Stunden nach einer Thrombolysetherapie (International Stroke Trial Collaborative Group 1997; DGN

2014). Bei Infarkten kardioembolischer Genese ist eine orale Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten oder neuen Antikoagulanzen (z.Bsp. Rivaroxaban, Dabigatran oder Apixaban) gemäß der aktuellen Leitlinien (DGN 2014) im Verlauf zu beginnen.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Therapie von Schlaganfallpatienten ist die frühzeitige Erkennung von Komplikationen. Die Gefahr einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes und eines Rezidivs kann durch eine Vorbeugung von Komplikationen erheblich minimiert werden. Die frühe Mobilisierung kann beispielsweise Dekubitalgeschwüre, Aspirationspneumonien und Thrombosen verringern. Unterstützend sind subkutan applizierte niedermolekulare Heparine bei bettlägerigen Patienten sinnvoll. Sie senken das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose bzw. einer Lungenarterienembolie, ohne das Blutungsrisiko nach einem Schlaganfall signifikant zu erhöhen (Diener et al. 2006; Sherman et al. 2007). Eine weitere schwerwiegende Komplikation stellt die Zunahme des intrakraniellen Druckes dar, der häufig mit einem Ödem des infarzierten Areals einhergeht, das meist 24 bis 78 Stunden nach dem initialen Schlaganfall auftritt (Dávalos et al. 1999). Besonders jüngere Patienten mit ausgedehnten Infarkten des Medialstromgebietes neigen zu massiven Hirnschwellungen (Rieke et al. 1995). Daher ist eine konservative Therapie beispielsweise mit Osmodiuretika oder eine chirurgische Dekompression nach Auftreten entsprechender Symptome indiziert. Die Letalität als auch der Grad einer späteren Behinderung lässt sich durch die operative Maßnahme einer dekompensiven Hemikranieektomie nach Einhaltung der Indikationsstellung deutlich reduzieren (Gupta et al. 2004). Infektionen sollten forciert behandelt werden, eine prophylaktische Antibiotikatherapie ist jedoch nach derzeitigen Leitlinien und dem aktuellen Forschungsstand nicht empfohlen (Chamorro et al. 2005; Schwarz et al. 2008; DGN 2012).

2.4 Hintergrund der experimentellen Studie

Ziel der Schlaganfallforschung ist die stetige Verbesserung der bestehenden Behandlungsstrategien. Hierbei stehen lebensverlängernde und lebensqualitätsfördernde Therapien im Mittelpunkt. Während die pathophysiologischen Mechanismen des Schlaganfalls mittlerweile sehr gut untersucht sind, wird insbesondere im Bereich einer effektiven, über die revaskularisierenden Maßnahmen hinausgehenden Therapie geforscht. Vor allem das Wissen über Mechanismen endogener Neuroprotektion und regenerativer Vorgänge ist wichtig, um diese therapeutisch einsetzen zu können (Prass et al. 2003; Dirnagl et al. 2009). Es existieren zahlreiche, von unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgehende Studien, die zur Verbesserung

der Schlaganfalltherapie beitragen. Im Zuge neuer Erkenntnisse experimenteller und klinischer Untersuchungen gelangt zunehmend die Rolle des Immunsystems und dessen Interaktion mit dem ZNS in den Fokus der Forschung. In vorangegangenen Studien konnte das Immundepressionssyndrom nach ischämischem Schlaganfall, in dessen Folge es zu schweren bakteriellen Infektionen kommen kann, im experimentellen Rahmen belegt werden (Chamorro et al. 2012; Klehmet et al. 2009; Dirnagl et al. 2007). Insbesondere das Auftreten einer Pneumonie ist während der Akutphase nach wie vor eine der häufigsten klinischen Komplikationen nach einem ischämischen Schlaganfall, auch auf spezialisierten *Stroke Units* oder Intensivstationen (Hilker et al. 2003). Die Häufigkeit korreliert mit dem Schweregrad und der Lokalisation des Schlaganfalls, so steigt die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Respirationstraktes beispielsweise nach einer Okklusion der A. cerebri media im Gegensatz zu einer Ischämie des anterioren oder posterioren Stromgebietes (Hamidon et al. 2003).

Die Pneumonie ist mit einer Inzidenz von bis zu 33% einer der wichtigsten Risikofaktoren in Bezug auf die Mortalität und Morbidität (Emsley & Hopkins 2008; Langhorne et al. 2000; Katzan et al. 2003). Die Prävention und frühzeitige Behandlung der Folgen des SIIDS stellen erfolgsversprechende Ansätze dar, um die Langzeitprognose nach einem Schlaganfall zu verbessern. So untersuchten unterschiedliche randomisierte Phase IIb-Studien die Fragestellung, ob eine präventive Anwendung von Antibiotika einen positiven Effekt auf den Behandlungsverlauf von Schlaganfallpatienten ausüben kann. Während die PANTHERIS- und die MISS-Studie einen günstigen Einfluss des Antibiotikums bestätigten, hinterfragt die ESPIAS-Studie diesen Ansatz kritisch (Klehmet et al. 2009; Schwarz et al. 2008; Chamorro et al. 2005). Eine Metaanalyse dieser unterschiedlichen klinischen Studien zeigte, dass eine antibiotische Therapie die Inzidenz von schlaganfallassoziierten Infektionen von 38,1% auf 23,5% reduziert, jedoch insgesamt keinen Effekt auf die Mortalitätsrate hat (van de Beek et al. 2009). Im Gegensatz dazu zeigte eine experimentelle Studie nicht nur eine deutliche Mortalitätsreduktion unter präventiver Antibiotikatherapie, sondern auch eine Verbesserung des neurologischen Defizits nach stattgehabtem Schlaganfall (Meisel et al. 2004). Die aktuellen Leitlinien für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls empfehlen eine unmittelbare Behandlung von diagnostizierten Infektionen. Dies entspricht dem aktuellen „Goldstandard“ (DGN 2012). Die Frage über einen möglichen Nutzen einer präventiven Antibiotikatherapie hinsichtlich der Verbesserung des funktionellen Ergebnisses sowie deren Einfluss auf Mortalität und Morbidität von Schlaganfallpatienten, blieb bisher ungeklärt.

2.5 Arbeitshypothesen

Mit den Erfahrungswerten experimenteller (Meisel et al. 2004) sowie klinischer Untersuchungen, wie der PANTHERIS-, MISS- und ESPIAS-Studie (Klehmet et al. 2009; Schwarz et al. 2008; Chamorro et al. 2005), wurde für die hier vorliegende Arbeit ein Studiendesign entwickelt, bei dem der klinische Hintergrund in das experimentelle Modell einfließt. Das Ziel war eine exaktere Modellierung der klinischen Situation („*from bed to bedside*“). Neben dem Vergleich der präventiven Antibiotikatherapie (PAT) mit einem Placebo sollte nun auch die in der Klinik geltende Standardtherapie in die Versuche mit einbezogen werden. Mit dieser Vorgehensweise konnte die präventive antibiotische Behandlung im Vergleich mit dem aktuellen Therapiestandard hinsichtlich ihrer Auswirkung auf Infektionsrate, die Mortalität, das neurologische Ergebnis als auch auf immunologische Veränderungen untersucht werden, wie es in klinischen Untersuchungen in dieser Form nicht möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die PAT sowohl einen günstigen Einfluss auf die Langzeitprognose bezüglich neurologischer Defizite als auch auf die Reduktion des Sterblichkeitsrisikos hat. Für diese Studie sind folgende Hypothesen aufgestellt worden:

- 1) *Die präventive Antibiotikatherapie (PAT) kann die Infektionsrate einer Pneumonie nach einem Schlaganfall im Vergleich zur Standardtherapie deutlich reduzieren.*
- 2) *Durch die Anwendung einer PAT ist der allgemeine Gesundheitszustand im Vergleich zur Standardtherapie deutlich verbessert.*
- 3) *Gegenüber der Standardtherapie führt die PAT zu einer Verbesserung schlaganfallbedingter neurologischer Defizite.*
- 4) *Die PAT ist der herkömmlichen Standardtherapie des ischämischen Schlaganfalls hinsichtlich der Sterblichkeitsreduktion überlegen.*

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden, um die Umsetzung des Studiendesigns zu ermöglichen. Hierfür wurde die MRT für die Diagnose einer Pneumonie im Mausmodell etabliert. Des Weiteren wurde ein Maßstab zur Evaluation des allgemeinen Gesundheitszustandes der Maus entwickelt, wodurch die tägliche Einschätzung bezüglich des Krankheitsbildes der Versuchstiere objektiviert werden konnte. Der Score ist

insbesondere für die Entscheidung von Bedeutung, wann die antibiotische Therapie bei der Standardgruppe begonnen werden musste. Gemeinsam mit den MRT-Ergebnissen sollte der Gesundheitsscore einen zuverlässigen Anhaltspunkt für das Vorliegen einer Infektion darstellen. Die Diagnostik und Indikationsstellung einer notwendigen antibiotischen Behandlung ist an dieser Stelle ähnlich wie in der klinischen Situation durchgeführt worden. Um neurologische Defizite nach einem Schlaganfall zuverlässig untersuchen und beurteilen zu können, musste zusätzlich eine Methode entwickelt werden, die schlaganfallspezifische Veränderungen aufzeigt. Dafür wurde das Verfahren der Ganganalyse genau untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht der verwendeten Materialien und Programme

In den nachfolgenden Tabellen sind verwendete Substanzen und Pharmaka, Laborgeräte und Equipment sowie benötigte Programme mit Angabe der jeweiligen Hersteller aufgeführt.

Name (Wirkstoff/Typ)	Hersteller	Anmerkungen
Gradientenlösung 35%	im Labor	35% Easycoll in RPMI 1640 (s.u.)
Gradientenlösung 70%	im Labor	70% Easycoll in RPMI 1640 (s.u.)
Baytril® 2,5% (Wirkstoff: Enrofloxacin)	Bayer Vital, Leverkusen, DE	Verumpräparat, 10 mg/kg KG oral
Easycoll (35% und 70%)	Biochrom, Berlin, DE	Trennlösung für die Isolation mononuklearer Zellen aus dem Gehirn (mit RPMI 1640)
Ethanol 70%	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Desinfektionsmittel für MCAO und Organentnahme
FACS-Puffer	im Labor	2% Fötales bovines Serum in PBS-Lösung
Forene® 2,5% (Wirkstoff: Isofluran)	Abbott, Wiesbaden, DE	Inhalationsnarkotikum für MCAO, MRT 0,5 l/min inhalativ
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, DE	Zellkultur, FACS
Ketamin-Actavis® (Wirkstoff: Ketamin)	DeltaSelect, Dreieich, DE	Injektionsnarkotikum, Organentnahme (Lunge), 100 mg/kg KG s.c.
Ketavet® (Wirkstoff: Ketamin)	Pfizer GmbH, Berlin, DE	Injektionsnarkotikum, transkardiale Perfusion, Organentnahme (Gehirn), 150 mg/kg Kg s.c.
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Berlin, DE	Zellkultur, FACS
Natriumchlorid 0,9% (steril)	B. Braun, Melsungen, DE	Trägerlösung für das Verumpräparat und als "Placebo" verwendet, 1 ml oral
Optosil® (Universal Plus)	Heraeus Kulzer, Wehrheim, DE	Aktivator für den Silikonüberzug der Filamentherstellung
PBS-Lösung (ohne Ca ²⁺ , Mg ⁺)	Biochrom, Berlin, DE	Zellkultur, FACS

Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin, DE	Zellkultur, FACS
Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazin)	Bayer Vital, Leverkusen, DE	Injektionsnarkotikum, Organentnahme, transkardiale Perfusion: 10-15 mg/kg KG s.c.,
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, DE	Zellkulturmedium, FACS Analyse
Xantopren® (M mucosa)	Heraeus Kulzer, Wehrheim, DE	Silikon für die Filamentherstellung, MCAO
Xylocain® Gel 2% (Wirkstoff: Lidocain)	AstraZeneca, London, UK	Lokalanästhetikum, MCAO

Tab. 2 Übersicht verwendeter Substanzen und Pharmaka mit Angabe der Hersteller und des Firmensitzes (Postalische Abkürzungen: DE - Deutschland, UK - United Kingdom, USA - United States of America, NL - Niederlande).

Name (Typ)	Hersteller	Anmerkungen
7-Tesla Kleintier-MRT (Pharmascan 70/16)	Bruker BioSpin, Ettlingen, DE	MRT Bildgebung, Infarkt volumetrie, Lungen bildgebung
8.0 Nylon Mono- filament	Suprama, Berlin, DE	Filamentherstellung, Zuschnitt auf 11 mm
Anatomische Pinzette	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	MCAO, Organentnahme
BD LSRII Flusszytometer	BD Biosciences, San José, CA, USA	Durchflusszytometrie, FACS
CatWalk XT	Noldus, Wageningen, NL	Ganganalyse System
Chirurgische Pinzette	B Braun, Melsungen, DE	Organentnahme, MCAO
Chirurgische Schere	Fine Science Tools, s.u.	Hautschnitt, MCAO
Dumont Pinzette (<i>Medical #5 straight tip</i> 0,05mm x 0,02 mm)	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	MCAO
FACS Rundboden- röhrchen	BD Biosciences, San José, CA, USA	Behältnis für Zellpellets und Lösungen, FACS
Fadenklemme	Fine Science Tools, s.u.	MCAO
Gefäßschere (<i>spring scissor</i>)	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	Inzision der Gefäßwand, MCAO
Isofluranverdampfer	Völker, Kaltenkirchen, DE	Inhalationsanästhesie: MCAO, MRT
Lichtquelle für Stereo- mikroskop (KL 1500)	Leica Microsystems, Wetzlar, DE	MCAO
Standardkäfig, Maus- tunnel/ Iglu	Plexx BV, Elst, NL	Käfige und Ausstattung
Mikropinzette	B Braun, s.o.	MCAO, Organentnahme
Mikrovaskuläre Gefäß- clips nach BIEMER	Aesculap, Tuttlingen, DE	Temporärer Gefäßclip, MCAO (5mm x 9mm, 20-25g)
Monitoring-System (<i>Small Animal Monitoring & Gating System</i>)	SA Instruments, Stony Brook, NY, USA	Gating System für MRT-Untersuchung der Lunge und des Gehirnes

Nadelhalter	Fine Science Tools, s.u.	MCAO
Nahtmaterial (4.0 - 8.0 Fäden)	Suprama, Berlin, DE	Nahtmaterial MCAO
Pinzette (<i>Graefe Forceps, straight</i>)	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	MCAO
Anlegepinzetten für Gefäßclip	Aesculap, Tuttlingen, DE	MCAO
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, DE	FACS, Zellfärbung
Selbstregulierendes Heizkissen (<i>Animal Heating pad, small</i>)	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	Temperaturmonitoring und Wärmezufuhr während der MCAO
Skalpell	Fine Science Tools, Heidelberg, DE	Filamentherstellung, MCAO, Organ- entnahme
Spatel, löffelförmig	Roth, Karlsruhe, DE	Organentnahme
Stereomikroskop (MZ6 Stemi 2000 C)	Leica Zeiss, Deisenhofen, DE	Mikroskop für MCAO (6x - 40x Vergrößerung)
Wärmebox (<i>Veterinary Recovery Chamber, VI200</i>)	Peco Services, Cumbria, UK	Aufenthaltort der Tiere direkt nach MCAO, Schutz vor Auskühlen
Zellsieb (70 µm)	BD Biosciences, San José, CA, USA	Isolation mononuklearer Zellen, FACS
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon, San José, CA, USA	Isolation mononuklearer Zellen, FACS

Tab. 3 | Auflistung der verwendeten Materialien und Laborgeräte mit Angabe der Hersteller.

Name (Typ)	Hersteller	Anmerkungen
Analyze (Version 5)	AnalyzeDirect, Overland Park, KS, USA	Infarktvolumentrie
Bruker Paravision (Version 4.0)	Bruker Biospin, Ettlingen, Deutschland	Messungen am 7-Tesla-MRT
CatWalk™ XT (Version 9.1)	Noldus Technology, Wageningen, Niederlande	Ganganalyse
FACSDiva (Version 6.0)	BD Biosciences, San José, CA, USA	Durchflusszytometrie
FlowJo (Version 9.5)	Tree Star, Ashland, OR, USA	Auswertung der FACS Analyse
ImageJ (Version 1.42q)	Wayne Rasband, National Insti- tutes of Health, USA	Auswertung der Lungeninfiltration
SPSS (Version 14.0)	SPSS Inc., Chicago, IL, USA	Statistische Auswertung
SPSS Statistik (Version 18.0)	IBM Somers, NY, USA	Statistische Auswertung
G*Power (Version 3.1.2)	Faul et al. 2007, http://www.gpower.hhu.de/	Berechnung der Effektstärke und Stichprobenkalkulation

Tab. 4 | Übersicht der verwendeten Programme und ihre jeweilige Anwendung.

3.2 Verabreichung der verwendeten Pharmaka

Das Antibiotikum Enrofloxacin (Baytril® 2,5%) aus der Gruppe der Gyrasehemmer wurde den Versuchstieren in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht in einer 1:12,5 Natriumchlorid Lösung (2 mg/ml) über einen Zeitraum von 7 Tagen, zweimal täglich oral per Schlundsonde appliziert. Die Tiere der Placebogruppe erhielten die gleiche Menge physiologischer Natriumchloridlösung. Der Beginn der antibiotischen Therapie wurde angepasst: Die präventive Gruppe erhielt das Antibiotikum direkt nach der MCAO, die Standardgruppe erhielt das therapeutische Medikament nach dem Auftreten von klinischen Zeichen einer Infektion, die sich typischerweise zwischen dem 4. und 6. Tag (Gesundheitsscore > 5 Punkte) zeigte oder nach der Diagnose einer Pneumonie in der kernspintomografischen Bildgebung (Flächenanteil von > 5% hyperintenser Signale des gesamten Lungenparenchyms). Für eine ausgiebige Analgosedierung wurde Ketamin und Xylazin als Gemisch subkutan in eine abdominelle Hautfalte gespritzt. Vor der Lungenentnahme wurde eine Kombination aus beiden Pharmaka mit einer Dosierung von 100 mg (Ketamin) bzw. 10 mg (Xylazin) pro Kilogramm Körpergewicht appliziert. Für die immunologischen Untersuchungen und der hierfür erforderlichen Entnahme des Gehirns mit vorheriger transkardialer Perfusion wurde eine höhere Dosierung mit 150 mg Ketamin beziehungsweise 15 mg Xylazin angewendet. Isofluran wurde sowohl für den chirurgischen Eingriff der MCAO als auch für die Sedierung der Tiere während der MRT verwendet. Es wurde zusammen mit einem 1:2 Sauerstoff-/Stickstoffgemisch über eine Atemmaske gegeben.

3.3 Versuchstiere und Unterbringung

Für die Versuche wurden 11 – 14 Wochen alte, männliche C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Das Ankunftszeitpunkt betrug zwischen 20,9 - 25,6 Gramm. Die Unterbringung erfolgte in entsprechend mit Holzspänen und Spielzeug (Maustunnel und Iglu) ausgestatteten Käfigen. Die Beleuchtung erfolgte nach einem 12-stündigen Tageszyklus, der um 7 Uhr begann. Die Tiere verfügten über einen *ad libitum* Zugang zu Wasser und Standard-Trockenfutter. Alle Experimente wurden nach den europäischen Richtlinien zum Schutz, der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010) durchgeführt und von der lokal zuständigen Behörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin).

3.4 Studiendesign

In dieser Arbeit wurde angestrebt, die klinische Behandlung von Schlaganfallpatienten in ein tierexperimentelles Modell zu übertragen. Die Kontrollgruppe erhielt daher in Anlehnung an klinische Studien einen "Placebo", der aus der Trägerlösung (Natriumchlorid) für das Verummedikament bestand. Gemäß der in den Leitlinien empfohlenen Standardtherapie erhielten die Tiere der Standardgruppe das Verum (Enrofloxacin, siehe Kapitel 3.3) erst nach der Diagnose einer Pneumonie. Im Gegensatz dazu wurde den Tieren der präventiven Behandlungsgruppe das Antibiotikum direkt nach dem Schlaganfall verabreicht. Die Tiere wurden randomisiert in die 2 unterschiedlichen Behandlungsgruppen bzw. in die Kontrollgruppe eingeteilt. Das Studiendesign ist in der Abbildung 3 dargestellt.

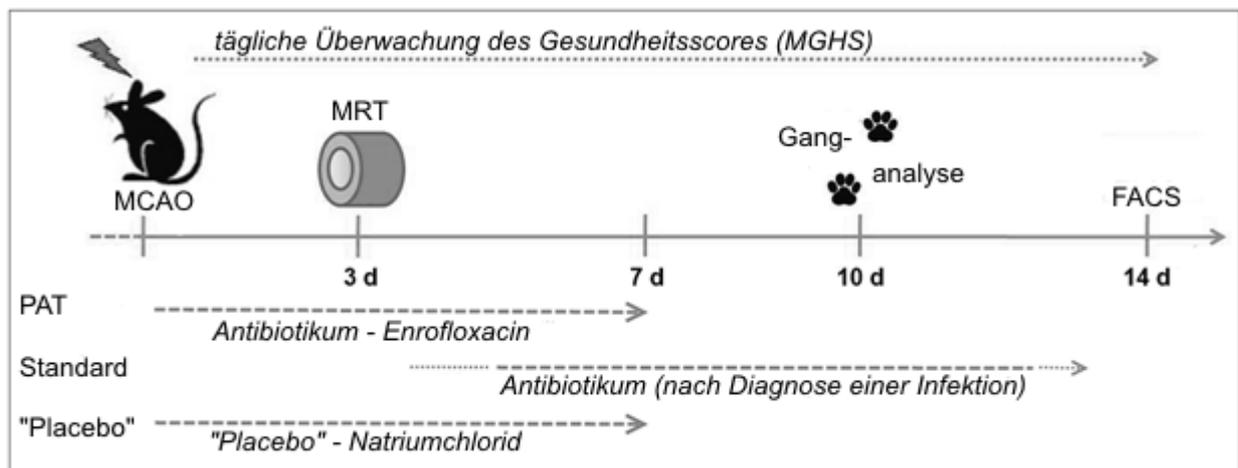


Abb. 3| Experimentelles Studiendesign zur Untersuchung einer präventiven Antibiotikatherapie im Vergleich zur Standardtherapie nach Auftreten eines Schlaganfalls. Die Tiere der präventiven Behandlungsgruppe erhielten das Antibiotikum Enrofloxacin direkt nach der MCAO. Nach drei Tagen erfolgte eine MRT-Bildgebung der Lunge, um eine mögliche Lungeninfektion zu diagnostizieren. Die Therapie der Standardgruppe wurde erst nach Diagnose einer Infektion (Kriterien: MGHS > 5 Punkte und/oder MRT > 5%) begonnen. Die Placebogruppe erhielt den "Placebo" Natriumchlorid ebenfalls für einen Zeitraum von 7 Tagen, beginnend am Tag der MCAO. 10 Tage nach dem Schlaganfall erfolgte die Ganganalyse zur Beurteilung neurologischer Defizite. Nach 14 Tagen war das Versuchsende erreicht, die Gehirne wurden entnommen und der FACS-Analyse zugeführt (Abbildung nach Hetze et al. 2013).

Zunächst wurde ein Schlaganfall durch eine Okklusion der A. cerebri media (MCAO - *middle cerebral artery occlusion*) hervorgerufen. Die Tiere der präventiven Therapiegruppe (n = 26) erhielten im Anschluss an die Operation den Gyrasehemmer Enrofloxacin. Tiere, die der Standardtherapie (n = 25) zugeführt wurden, erhielten das Antibiotikum (Enrofloxacin) unverzüglich nach der Diagnose einer Lungeninfektion mittels bildgebendem Verfahren

(frühestens am Abend des 3. Tages) oder nach Auftreten von klinischen Anzeichen einer Infektion, die mit dem Gesundheitsscore evaluiert wurde. Der Placebogruppe wurde zu keiner Zeit ein Antibiotikum verabreicht, stattdessen erhielten die Versuchstiere die gleiche Menge oral verabreichter steriler Kochsalzlösung. 3 Tage nach der MCAO wurde die Lunge mittels MRT untersucht (n = 39). Sowohl die präventiv als auch die nach Standardtherapie behandelten Tiere wurden mit der Placebogruppe verglichen (n = 29, Natriumchlorid). Der allgemeine medizinische Zustand der Tiere wurde jeden Tag nach objektivierte Kriterien (Gesundheitsscore, Kapitel 2.7.3) untersucht. Neurologische Defizite wurden mit dem entwickelten Ganganalyseverfahren am 10.Tag nach der MCAO evaluiert. Nach einem Versuchszeitraum von insgesamt 14 Tagen wurden die Tiere mit einer entsprechenden Anästhesie, bestehend aus Ketamin und Xylazin, vollständig betäubt und das Gehirn anschließend für die immunologische Untersuchung entnommen. Alle Untersuchungen wurden verblindet durchgeführt. Dem Untersucher war zu keiner Zeit die jeweilige Gruppenzuordnung der Versuchstiere bekannt.

3.5 Das Schlaganfallmodell der Maus

Der chirurgische Eingriff zum Verschluss der Arteria cerebri media (*middle cerebral artery occlusion*) wurde gemäß der Standard-Operationsprozedur (SOP) des Labors durchgeführt (Engel et al. 2011; Dirnagl & the members of the MCAO-SOP Group 2009). Das Versuchstier wurde hierfür zunächst mit 1,5% - 2% Isofluran und einem 1:2 Gemisch aus Sauerstoff und Stickstoff narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf einer beheizten Matte fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde Isofluran mit einer Konzentration 1% - 1,5% kontinuierlich mit dem Sauerstoff-/Stickstoffgemisch über eine selbst hergestellte Nasenmaske gegeben. Der Operationsbereich am Hals des Tieres wurde mit 70% Ethanol abgewaschen und steril getrocknet. Es folgte nun eine ca. 1,5 - 2 cm lange Inzision der ventralen zervikalen Mittellinie und anschließende Darstellung der Glandula submandibularis unter dem Operationsmikroskop. Die Bindegewebskapsel wurde stumpf mit der Pinzettenrückseite präpariert, die Drüsenanteile sowie die paratracheale Halsmuskulatur sind im nächsten Schritt nach lateral mobilisiert und temporär mit einem 5.0/6.0 Faden an einer Klemme fixiert worden. Nach Darstellung der linksseitigen A. carotis communis (LCCA) und ihrer Aufteilung wurde diese mit einer Ligatur (5.0 - 7.0 Faden) verschlossen, ohne hierbei den direkt anliegenden Nervus vagus zu schädigen. Das Gleiche ist bei der A. carotis externa (LECA) mit einem 6.0

Faden durchgeführt worden. Für die linke A. carotis interna (LICA) wurde ein Knoten für einen späteren Verschluss an der entsprechenden Lokalisation vorbereitet. Nach Aufsetzen eines temporären mikrovaskulären Clips auf die LICA ist eine kleine Öffnung kurz vor der Bifurkation der A. carotis communis in die Gefäßwand geschnitten worden (*spring scissors*). Über diesen Zugang wurde ein vorbereitetes Monofilament vorsichtig bis in die A. carotis interna bis zum Gefäßclip vorgeschoben (Abbildung 4). Das angefertigte Filament bestand aus einem 8.0 Nylonfaden, der unter dem Mikroskop zu einer Länge von 11 mm zugeschnitten wurde. Mit einer Pinzette wurde dieser anschließend durch eine Mischung aus Xantopren M Mucosa und Aktivator Optosil gezogen, um einen glatten Überzug von 8 mm Länge zu erhalten.

Der Gefäßclip wurde nun geöffnet und das Filament über die A. carotis interna bis zum Ursprung der linken A. cerebri media (LMCA) vorgeschoben. Der vorbereitete Knoten ist anschließend so geschlossen worden, dass das einliegende Filament fixiert wurde und kein Blut über die Öffnung in der Gefäßwand austreten konnte. Die Wunde wurde mit einem Lidocain Gel (Xylocain Gel 2%) und einer temporären Naht versorgt.

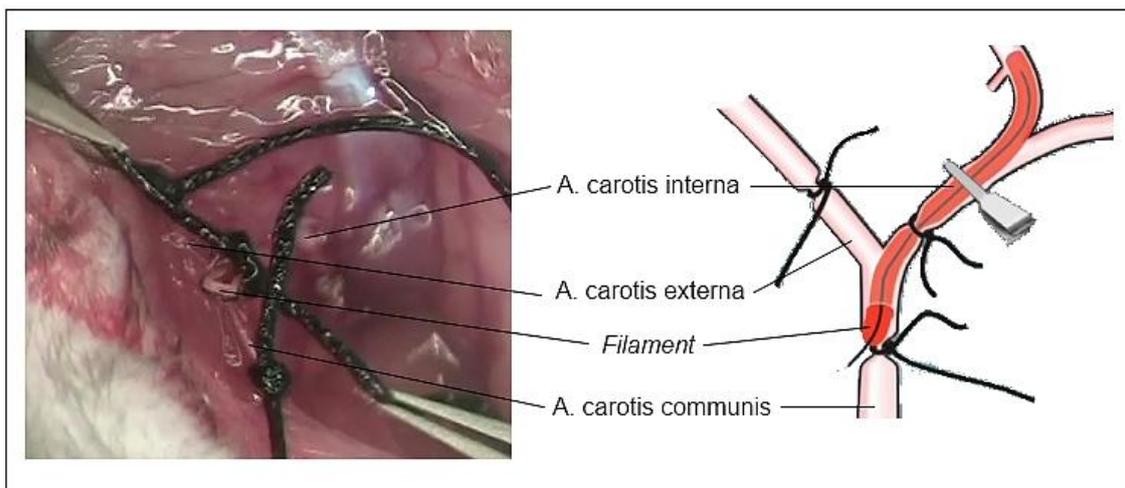


Abb. 4 Beispiel eines Operationssitus der MCAO mit schematischer Darstellung. In dieser Abbildung befinden sich bereits Ligaturen an der A. carotis communis und der A. carotis externa. Durch eine Inzision der LCCA wird das Filament in die LICA bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben. Das Filament verbleibt in dieser Position für 60 min und wird nach der Ischämiezeit durch Eröffnung des Knotens entfernt. Die Ligaturen der A. carotis interna sowie externa verbleiben, es erfolgt eine Kollateralisierung der Gegenseite.

Die Mäuse verblieben während der Ischämiezeit von 60 min in einem beheizten Käfig (*Veterinary Recovery Chamber*). Bei Blutverlusten erhielten die Tiere 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung als Volumenersatzmittel. Für die Reperfusion wurde entsprechend eine erneute Anästhesie durchgeführt und der Knoten an der A. carotis interna zur Entfernung des Filaments vorübergehend geöffnet. Nach einer Kürzung der verbleibenden Ligaturen wurde die Haut

adaptiv verschlossen (5.0 Faden). Hiernach erhielten alle Tiere zur Kreislaufstabilisierung ein Volumenersatzmittel (Natriumchlorid). Die Mäuse verblieben für weitere 1 - 2 Stunden zur Erholung in dem beheizten Käfig. Während des Operationszeitraumes wurde die Körpertemperatur der Tiere mit einer rektalen Temperatursonde und einer rückkoppelungs-gesteuerten Heizdecke überwacht. Der Erfolg der Operation wurde mithilfe des in der Tabelle 5 dargestellten Bederson Scores verifiziert (Bederson et al. 1986).

Bederson Score	Beobachtbare Defizite
Grad 0	Normaler Zustand, keine Defizite
Grad 1	Moderat, Flexion der Vorderglieder
Grad 2	Schwer, Flexion der Vorderpfoten, reduzierte Abwehrbewegung bei seitlicher Berührung, kein <i>Circling</i>
Grad 3	Schwer, wie Grad 2 mit <i>Circling</i>

Tabelle 5 | Der Schweregrad eines Schlaganfalls nach der MCAO kann mithilfe des Bederson Score objektiviert werden. Hierfür werden neurologische Defizite am Versuchstier untersucht und mit einer Punktzahl von 0 - 3 bewertet. Die Punktzahl entspricht hierbei dem Schweregrad. Das *Circling* beschreibt eine einsetzende Kreisbewegung (ipsilateral zur ischämischen Hemisphäre), sobald die Maus versucht sich fortzubewegen.

3.6 Infarktvolumentrie

Für die Messung der Infarktgröße wurde am 1. Tag nach der MCAO ein MRT durchgeführt (7-Tesla Kleintier-MRT, mit einer 98/38 mm RF Spule, im Rahmen der Teilstudie der Ganganalyse). Die Narkose der Tiere wurde inhalativ mit einem 3,5 - 4% Isofluran- und Sauerstoffgemisch eingeleitet und für die Dauer des MRTs mit 1,5% Isofluran und einem Sauerstoff-/Stickstoffgemisch aufrecht erhalten. Physiologische Parameter wie Körpertemperatur und Atemfrequenz sind mit einem MRT-fähigen Monitoring-System überwacht worden. Wurde eine Körpertemperatur von 36°C - 37°C über- oder unterschritten, konnte die Wärmezufuhr über eine rückkoppelungsgesteuerte Heizdecke entsprechend angepasst werden. Der Kopf wurde in einem stereotaktischen Rahmen positioniert. Im Anschluss wurden T2-gewichtete MRT Bilder mit einer "TurboRARE" Sequenz angefertigt. Zwischen dem Zerebellum und Bulbus olfactorius wurden axiale Schichten ausgewählt (20 Schichten, Schichtdicke 0,5 mm, planare Auflösung 256 x 256, FOV 28.5 mm, TR 3500 ms, TE 56 ms, Aufnahmezeit 6 min). Mit dem Programm Analyze 5.0 konnte die Läsionsgröße halbautomatisch bestimmt werden.

3.7 Immunologische Untersuchungsmethoden

3.7.1 Organentnahme

Damit eine genaue Bestimmung der in das ZNS eingewanderten mononuklearen Zellen erfolgen konnte, mussten zuvor im Blut zirkulierende Immunzellen aus dem Gefäßsystem entfernt werden, da diese das Ergebnis der tatsächlich in das Gehirn immigrierten Immunzellen verfälschen würden. Vor Organentnahme wurde das Gefäßsystem der Mäuse daher transkardial mit einer Kochsalzlösung durchspült. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass das zu untersuchende Gewebe anatomisch erhalten bleibt und für die weiteren Schritte leicht fixiert werden kann.

Für eine vollständige Schmerzfreiheit wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion aus Ketamin (150 mg/kg KG) und Xylazin (15 mg/kg KG) anästhesiert. Nach vollständigem Erlöschen der Schmerz- und Schutzreflexe wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Es folgte die Thorakotomie mit Eröffnung der Peritonealhöhle und des Mediastinums. Nach Darstellung des Herzens wurde der linke Ventrikel inzidiert und das Herz mit einer Klemme fixiert. Um das Abfließen der Perfusionslösung zu ermöglichen, wurde auch der rechte Ventrikel eröffnet. Mit einer Spritze wurde anschließend Natriumchlorid in den linken Ventrikel perfundiert, bis die aus dem rechten Ventrikel herausgespülte Flüssigkeit eine klare Färbung aufwies. Hiernach wurde das Gehirn frei präpariert und entnommen. Anschließend ist das Gehirn in einem eisgekühlten RPMI 1640 Medium (angereichert mit 10% fetalem Kalbserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin) bis zum nächsten Arbeitsschritt der Zellisolation aufbewahrt worden.

3.7.2 Aufreinigung mononuklearer Zellen aus dem Gehirn

Die Hemisphären sind zunächst mit einem sterilen Skalpell getrennt worden. Die von dem Schlaganfall betroffene Gehirnhälfte wurde für die weitere Untersuchung verwendet. Nach Homogenisierung des Gewebes wurde eine Einzelzellsuspension durch die Verwendung eines Zellsiebes mit einer Porengröße von 70 µm hergestellt. Nach dieser mechanischen Trennung wurden die isolierten Zellen mit RPMI 1640 Medium gespült. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 300 g wurde das Zellpellet mit 6 ml einer 35% *Easycoll* Gradientenlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde vorsichtig auf 4 ml einer 70% *Easycoll* Gradientenlösung pipettiert, so dass sich eine Phasengrenze zwischen den beiden Lösungen bildete. Die Suspension ist im nächsten Schritt für 30 Minuten bei 900 g (m/s^2) zentrifugiert worden. Mit

Hilfe dieser Gradienten konnten Zellen verschiedener Dichtegrade voneinander isoliert und auf dem Medium aufgeteilt werden. Die Fraktion der mononuklearen Zellen wurde vorsichtig aus der Phasengrenze zwischen oberer und unterer Schicht entnommen und erneut mit dem RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Bestandteile aus der oberen Phasengrenze wurden verworfen. Die so aus dem Gehirn gewonnenen mononuklearen Zellen konnten nun der im nächsten Abschnitt erläuterten Zytometrie zugeführt werden.

3.7.3 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie kann eine Zelllösung hinsichtlich ihrer genauen Zusammensetzung in kurzer Zeit quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird zunächst über eine Kapillare eingesaugt. Mit der sog. hydrodynamischen Fokussierung wird erreicht, dass jeweils nur einzelne Zellen einer Suspension den Laserstrahl passieren. Das von der Zelloberfläche reflektierte Licht wird im nächsten Schritt durch zwei unterschiedlich positionierte Linsen gesammelt und passiert verschiedene Filter, die sich in den Fotoröhren befinden. Die gewonnenen Informationen werden am Ende in elektrische Impulse umgewandelt. Das gestreute Licht korreliert mit der Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Komplexität der einzelnen Zellen. Der sogenannte *Forward Scatter* detektiert das nach vorn gestreute Licht der Zelle, welches proportional zur Zellgröße ist. Das seitlich gestreute Licht wird durch die Granularität der Zelle beeinflusst und von dem sogenannten *Side Scatter* aufgenommen. Durch die spezifischen morphologischen Eigenschaften der Zellen lassen sich nach diesem Prinzip schnell und zuverlässig die Zellart und die jeweilige Anzahl in einer Suspension bestimmen. Das Spektrum dieses Prinzip kann mit Hilfe von entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern, die an den charakteristischen Oberflächenantigenen einer Zelle binden, erweitert werden. So lassen sich Subpopulationen einer Zellgruppe, die sich in ihrer Größe und Granularität sehr ähneln, weiter differenzieren.

Die aus dem Hirngewebe gewonnenen mononuklearen Zellen wurden in einem FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) Puffer gewaschen. Dieser bestand zu 2% aus fetalem Kalbsserum und zu 0,1% aus phosphatgepufferter Salzlösung. Die Proben wurden im nächsten Schritt mit den aufgelisteten fluoreszierenden Antikörpern eingefärbt (Tab. 6). Die jeweiligen Antikörper wurden hierfür zusammen mit den mononuklearen Zellen in einem Rundbodenröhrchen in einem abgedunkelten Raum für die Färbungsreaktion bei 4° C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 300 g wurden die Proben nach Zugabe von 100 µl des FACS-Puffers in das Durchflusszytometer überführt. Die Proben wurden mit einem BD LSR II

Flusszytometer und der FACSDiva™ Software untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit der Analyse-Software FlowJo.

Hersteller	Monoklonaler Antikörper mit Fluoreszenzmarker
BD Pharmingen San Diego, CA, USA	<ul style="list-style-type: none"> • FITC-konjugiertes anti-CD8a • PE-konjugiertes anti-CD44 • Alexa Fluor 700-konjugiertes anti-CD4 • PE-Cy7-konjugiertes anti-CD45
Caltag Laboratories Carlsbad, CA, USA	<ul style="list-style-type: none"> • Pacific Blue-konjugiertes anti-Gr1 • Pacific Orange konjugiertes anti-CD44RO
eBioscience San Diego, CA, USA	<ul style="list-style-type: none"> • Alexa Fluor 647-konjugiertes anti-CD3 • APC-Cy7-konjugiertes anti-CD11b • PE-Texas Red-konjugiertes anti-CD11c

Tabelle 6 | Auflistung der verwendeten monoklonalen Maus-Antikörper mit dem jeweiligen Fluoreszenzmarker.

3.8 Neu entwickelte Methoden

3.8.1 Ganganalyse als Verfahren zur Erhebung neurologischer Parameter

3.8.1.1 Hintergrund

Die Analyse neurologischer Symptome nach einem Schlaganfall ist zur Beurteilung des Ausmaßes der funktionellen Schädigung, die eine Abschätzung des Langzeitergebnisses ermöglicht, wichtig. Die hierfür verwendeten Testverfahren sind auch zur Einstufung der Wirksamkeit neuer Behandlungskonzepte nützlich. Für Patienten existieren bisher zahlreiche etablierte Testverfahren, welche Beeinträchtigungen der Kraft, Sensibilität, Sprache, Motorik und weitere Qualitäten evaluieren. Die Umsetzung dieser Tests gestaltet sich jedoch im Tiermodell schwierig. Viele der auftretenden funktionellen Defizite des Menschen können im Tiermodell nicht nachvollzogen werden. An dieser Stelle eignen sich gut beobachtbare Veränderungen des Verhaltens oder der Motorik, da diese objektiviert werden können.

Die Durchführung normaler Bewegungsabläufe erfordert sowohl bei dem Menschen als auch bei Tieren eine komplexe Zusammenarbeit verschiedener propriozeptiver und efferenter Kontrollmechanismen. Eine Störung der vielschichtigen Koordinationsabläufe äußert sich unter anderem in einer Veränderung des Gangbildes. Bisher wurden für das Mausmodell des

Schlaganfalls verschiedene Tests zur Beurteilung der Lokomotion eingeführt, um neurologische Schädigungen zu evaluieren. Die Sensitivität solcher Testverfahren, wie zum Beispiel dem Seilgang (*rope walk*, Carlini et al. 1967), Gitterlauf (*grid walk*, Kunkel-Bagden et al. 1993), Leitersprossenlauf (*ladder rung test*, Metz & Whishaw 2002) und der Fußabdruckanalyse (*foot print analysis*, de Medinaceli et al. 1982), ist bisher jedoch nicht aussagekräftig genug, um feine motorische Koordinationsstörungen zu ermitteln. Mit Hilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera und einem Laufband (Hampton et al. 2004) bzw. einer Glasplatte (Hamers et al. 2006) wurde in den genannten Studien versucht, die feinen Änderungen im Gangverhalten der Versuchstiere sichtbar zu machen. Es wurden auch Studien hinsichtlich schlaganfallinduzierter Gangstörungen an unterschiedlichen Modellen (Kloos et al. 2005) durchgeführt, zumeist mit Ratten. Der Mangel an einer etablierten Methode zur Untersuchung funktioneller Beeinträchtigungen im Mausmodell des Schlaganfalls stellt einen entscheidenden Nachteil dar. Die Untersuchung von Wang et al. (2008) zeigte, dass die Ganganalyse im Rattenmodell eine verlässliche und technisch gut durchführbare Methode zur Beurteilung des neurologischen Defizites ist. Auch im Mausmodell wurden nach distaler MCAO veränderte Koordinationsparameter festgestellt, einzelne Gangparameter wurden jedoch nicht weiterführend untersucht (Lubjuhn et al. 2009).

Das Prinzip der Ganganalyse war zum Zeitpunkt der für diese Arbeit durchgeführten Versuche noch nicht als Methode etabliert. Deshalb wurde im Rahmen dieser Promotion angestrebt, eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zu entwickeln, die Rückschlüsse auf funktionelle Beeinträchtigungen und das Ausmaß neurologischer Defizite im Mausmodell des Schlaganfalls zulässt. In dieser Studie sollte insbesondere eine Methode zur Beurteilung des funktionellen Mittel-/Langzeitresultates entwickelt werden, da diese Parameter für die Translation experimenteller Ergebnisse für die klinische Anwendung wichtig sein können.

3.8.1.2 Experimenteller Aufbau

Die Ganganalyse wurde mit einer automatischen computerassistierten Methode (CatWalk™, Noldus) gemäß der Herstellerempfehlungen und angelehnt an vorherige Studien (Hamers et al. 2001) durchgeführt. Das Equipment wurde in einem ruhigen und abgedunkelten Raum mit weniger als 20 Lux Beleuchtungsintensität aufgebaut. Das System bestand aus einer 1,3 m langen und erhöhten, mit fluoreszierendem Licht illuminierten Glasplatte (Abb. 5). Das im Inneren der Glasfläche reflektierte grüne Licht verließ aufgrund des veränderten Refraktionsindex die Glasplatte, sobald sich eine Pfote des Versuchstieres auf der Glasfläche befand. Die durch das gestreute Licht entstandenen "Fußabdrücke" wurden von einer darunter

befindlichen Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen. Die erfassten Bilder wurden von der Computersoftware des CatWalk™ Systems automatisch analysiert (Zuordnung der Pfoten, Geschwindigkeitsmessung, Druckintensität, etc.). Es erfolgte eine zusätzliche Kontrolle dieser automatischen Zuordnung durch den Untersucher. Am Ende des Gehweges der Apparatur wurde der jeweilige Heimkäfig des Versuchstieres als Lockmittel aufgestellt. Vor dem Hauptversuch wurden die Tiere mit drei Durchläufen trainiert, um sie an die Umgebung und die Aufgabe zu gewöhnen. Mit diesem Versuchsaufbau konnte ein zwangloser, natürlicher Lauf der Mäuse untersucht werden.

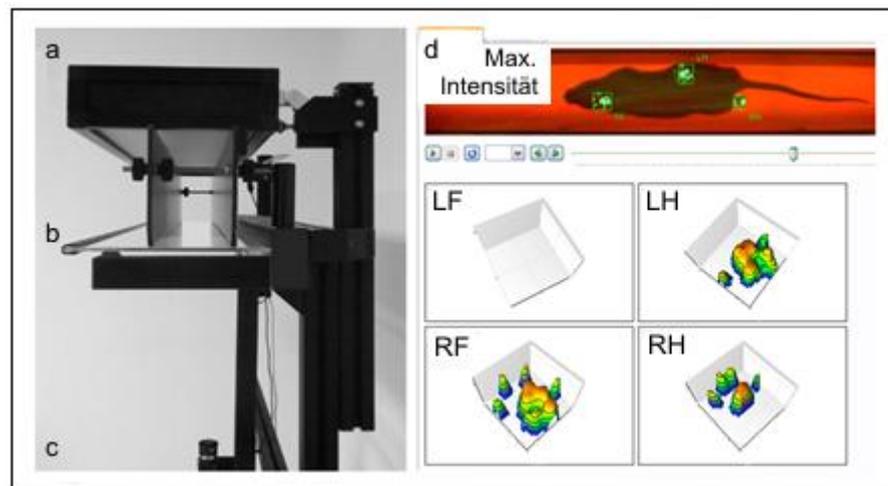


Abb. 5 | Darstellung des CatWalk™ Ganganalysesystems (links). Der Gehweg auf der Glasplatte ist seitlich durch Barrieren begrenzt. In der (a) oberen Abdeckung befindet sich rotes Licht, die (b) Glasfläche selbst wird mit grün fluoreszierendem Licht beleuchtet. Dieses Licht verlässt die Glasplatte, sobald sich eine Pfote darauf befindet (oben rechts) und wird von einer (c) Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen. Die gewonnenen Informationen werden anschließend über die angeschlossene (d) Software des Computers ausgewertet. Die Stärke des emittierten grünen Lichts gibt beispielsweise Aufschluss über die maximale Intensität des Pfotenabdruckes (rechts unten). Die Abdrücke werden der jeweiligen Extremität zugeordnet (Bsp. RH - rechte Hinterpfote, LF - linke Vorderpfote, usw.). Hierüber lassen sich komplexere Parameter, wie das Schrittfolgemuster oder der Regularitätsindex, bestimmen (Noldus Information Technology, Niederlande).

Vor der Messung wurden die Einstellungen der Kamera kalibriert (*Calibrate walkway*: 20 cm x 10 cm; *Intensity Treshold*: 0.07; *Camera gain*: 31.97) und festgelegt, welche Voraussetzungen ein absolvierter Lauf für die weitere Analyse erfüllen muss. Für alle Versuche ist eine Durchlaufzeit von 0,5 - 5 Sekunden und eine maximal zugelassene Geschwindigkeitsveränderung von 60% festgelegt worden. Ist das Versuchstier rückwärts gelaufen oder stehen geblieben, wurden diese Aufnahmen entsprechend ausgeschlossen und wiederholt. Insgesamt

wurden drei gültige Läufe pro Versuchstier akquiriert. Zum Versuchsende wurden die Gangparameter hinsichtlich ihrer Veränderungen vor und nach der MCAO untersucht.

3.8.1.3 Erhobene Gangparameter

Die Gangparameter wurden in 3 Hauptkategorien eingeteilt: (a) individuelle Parameter einzelner Fußabdrücke, (b) die Position einzelner Abdrücke zueinander und (c) zeitabhängige Beziehung zwischen den Abdrücken einzelner Pfoten. Zu den individuellen Parametern eines Pfotenabdruckes gehören zum Beispiel die Länge und Breite eines Abdruckes (mm) als auch die maximale Kontaktfläche (mm²). Die maximale Intensität (%) eines Pfotenkontaktes mit der Glasfläche zählt ebenfalls zu dieser Kategorie. Aus den Positionen einzelner Pfotenabdrücke zueinander können Parameter wie Schrittlänge (mm), Abdruckposition (mm) oder der sog. *Base of support* (BOS, mm) ermittelt werden. Dieser beschreibt den Abstand zwischen den beiden Vorder- bzw. den Hinterpfoten, d.h. eine Pfote unterstützt die andere bei der Fortbewegung um die Balance zu halten (siehe Abb. 6).

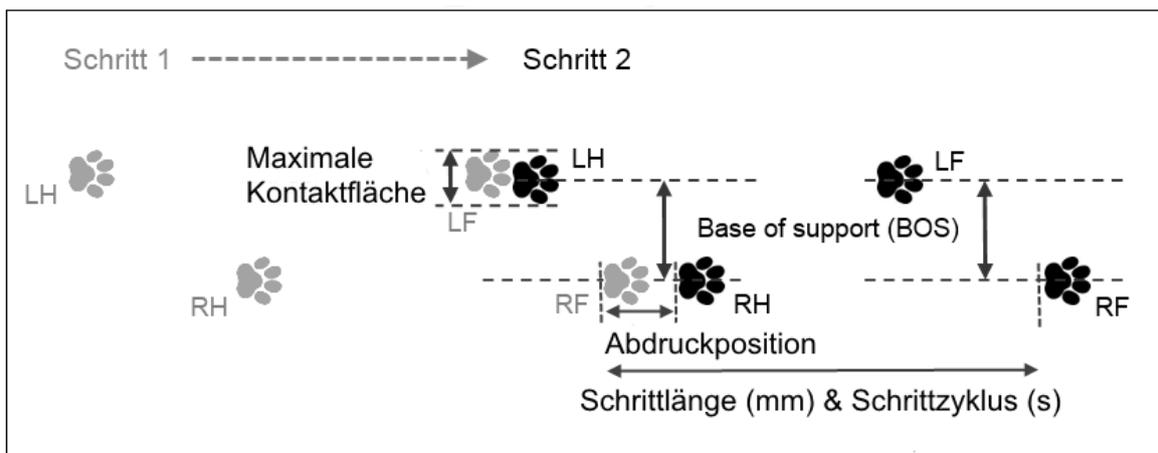


Abb 6 | Grafische Darstellung ausgewählter Gangparameter. Die grauen Fußabdrücke symbolisieren den ersten (zurückliegenden) Schritt, die schwarzen Abdrücke stellen den darauf folgenden Schritt dar. Einige Parameter ergeben sich aus der Beziehung zum vorherigen Schritt (bspw. Schrittlänge oder Schrittzklus), andere wiederum beziehen sich ausschließlich auf Qualitäten eines Fußabdruckes (maximale Kontaktfläche). Legende: LF bzw. RF (*left/right front*) - linke bzw. rechte Vorderpfote; LH bzw. RH (*left/right hind*) - linke bzw. rechte Hinterpfote.

Aus komplexeren und zeitabhängigen Beziehungen zwischen den einzelnen Abdrücken der Pfoten können außerdem Parameter, wie der Regularitätsindex (%) oder die sog. Phasendispersion (Hamers et al. 2006), bestimmt werden. Die Phasendispersion beschreibt hierbei den zeitlichen Ablauf eines initialen Kontaktes einer bestimmten Pfote im Verhältnis (%)

zum initialen Kontakt einer anderen festgelegten Pfote, die als sog. "Ankerpfote" fungiert. Die Berechnung der Phasendispersion wird in der Abbildung 7 erläutert. Dieser Parameter wurde durch Division der Verzögerung des initialen Kontakts der "Zielpfote" (relativ zur "Ankerpfote") durch die gesamte Dauer eines Schrittzklus berechnet (Kloos et al. 2005). Weitere Parameter sind in der Tabelle 7 kurz erläutert.

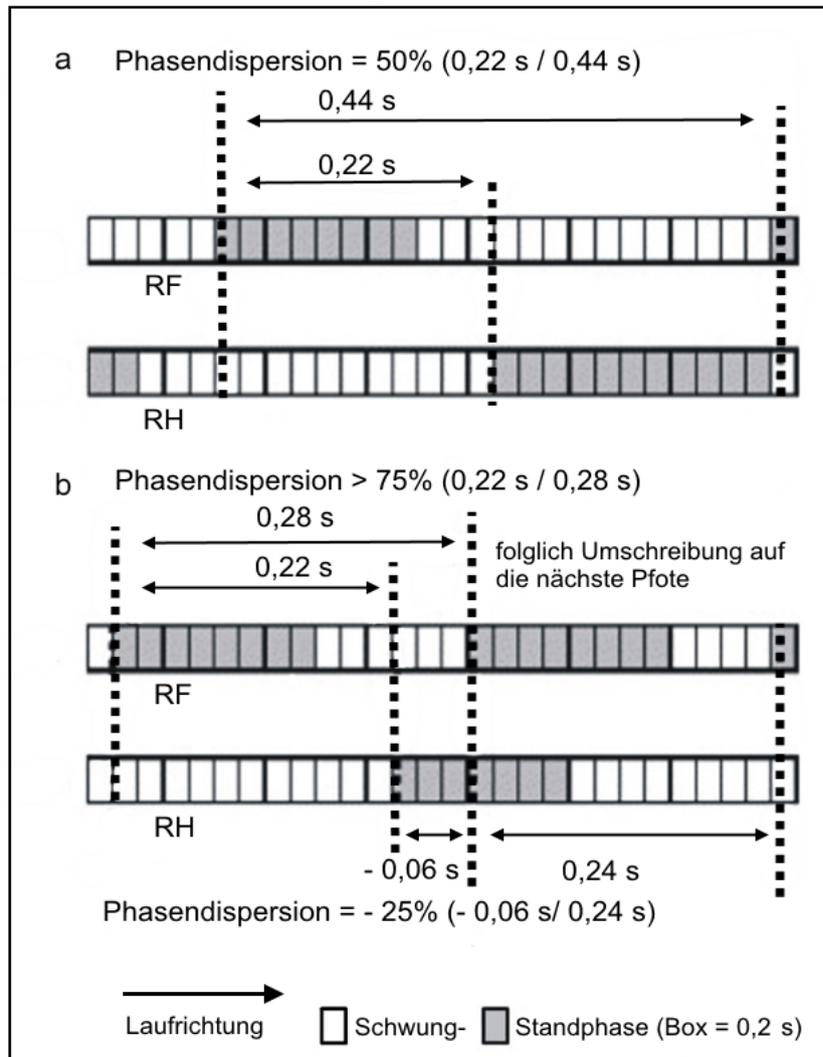


Abb. 7 | Grafische Darstellung und Berechnung der Phasendispersion. (a) Die Phasendispersion beschreibt das Timing zwischen den anfänglichen Kontakten eines Schenkelpaares (bspw. RF-RH) in Bezug auf die Dauer des Schrittzklus der sog. Ankerpfote (feststehende, stabilisierende Pfote eines Zyklus). (b) Überschritt die Phasendispersion einen Wert von 75%, so wurde die eigentliche Zielpfote als nächste Ankerpfote festgelegt (erschieden in Hetze et al. 2012).

Parameter	Definition
<i>Max. Contact Area (mm²)</i>	Fläche eines Fußabdruckes im Moment des maximalen Kontaktes mit dem Boden
<i>Max. Intensity (%)</i>	Intensität des maximalen Kontaktes einer Pfote mit der Glasfläche
<i>Run duration (s)</i>	Benötigte Zeit für die Absolvierung eines Laufes
<i>Normalized swing speed (s)</i>	Normalisierte Schwenkgeschwindigkeit; Geschwindigkeit mit der sich eine Pfote fortbewegt (Swing speed x run duration)
<i>Stand (s)</i>	Standphase der Pfote (Kontakt mit der Glasfläche zwischen zwei Schritten)
<i>Stride length (mm)</i>	Schrittlänge, Distanz zwischen aufeinanderfolgenden Schritten derselben Pfote
<i>Base of support (mm)</i>	Distanz zwischen den Vorder- bzw. Hinterpfoten zum Zeitpunkt der max. Kontaktintensität (Abb. 1a)
<i>Print positions</i>	Distanz zwischen der Position der Hinterpfote zur vorhergehenden Position der ipsilateralen Vorderpfote
<i>Duty cycle (%)</i>	Repräsentiert die relative Standphase als Teil des Schrittzklus
<i>Step cycle (s)</i>	Zeit zwischen den initialen Berührungen zweier aufeinanderfolgenden Schritte einer Pfote
<i>Step pattern</i>	Schrittfolgemuster (Alternierend: RF-RH-LF-LH o. LF-RH-RF-LH Kreuzend: RF-LF-RH-LH o. LF-RF-LH-RH, Rotierend: RF-LF-LH-RH o. LF-RF-RH-LH)
<i>Phase dispersion (%)</i>	Relation einer zuvor definierten Zielpfote zum Schrittzklus einer anderen, als "Anker" definierten Pfote
<i>Regularity index (%)</i>	Relative Anzahl normaler Schrittfolgemuster eines Durchlaufes
<i>Cadence</i>	Anzahl der Schritte pro Sekunde

Tabelle 7 | Übersicht und kurze Erläuterung der wichtigsten untersuchten Gangparameter. Die Gangparameter erfassen unterschiedliche Qualitäten der Koordination. Es werden sowohl einfache, auf die Zeit bezogene Parameter erhoben, wie beispielweise die Dauer eines Laufes (*run duration*), aber auch komplexe Parameter, die sowohl räumliche als auch zeitliche Qualitäten beinhalten.

3.8.2 Die MRT als Diagnostikmethode der Pneumonie

3.8.2.1 Experimenteller Versuchsaufbau

In einem separat durchgeführten Versuch sollte eine neue Methode zur radiologischen Diagnostik einer Lungenentzündung in einem *In-vivo*-Mausmodell entwickelt werden. Der bisherige Goldstandard besteht aus der Keimspektrumanalyse und Keimzahlquantifizierung von zuvor entnommenen Lungen der Tiere. Für die Versuche in dieser Arbeit war es notwendig, dass eine Lungenentzündung in der lebenden Maus diagnostiziert werden konnte, um zu einem späteren Zeitpunkt stattfindende Untersuchungen, wie beispielsweise die Ganganalyse, durchführen zu können. Basierend auf ein Versuchsprotokoll (Sheth et al. 2008) wurde drei Tage nach der MCAO die Lunge mit einer Magnetresonanztomografie (MRT) untersucht. Hierfür wurde ein 7-Tesla Kleintier-Scanner (Pharmascan 70/16) mit einem 16 cm langen, horizontalen Magneten und einer 9 cm durchmessenden Gradientenspule verwendet. Zusätzlich wurde ein 38 mm durchmessender ^1H -RF Volumenresonator benutzt. Es wurden 20 axiale Lungenschichten, mit einer Schnittdicke von 0,5 mm in der "T1 FLASH" Sequenz (TR 500 ms, TE 2.604 ms, 4 Durchschnittswerte) aufgenommen. Mit einem Sichtfeld (*field of view*, FOV) von 1,28 cm x 1,28 cm und einer Matrixgröße von 128 x 128 wurde eine Bildauflösung mit einem Wert von 100 μm pro Ebene erreicht. Die Software Paravision 4.0 diente für die Datenaufnahme und anschließende Bildverarbeitung.

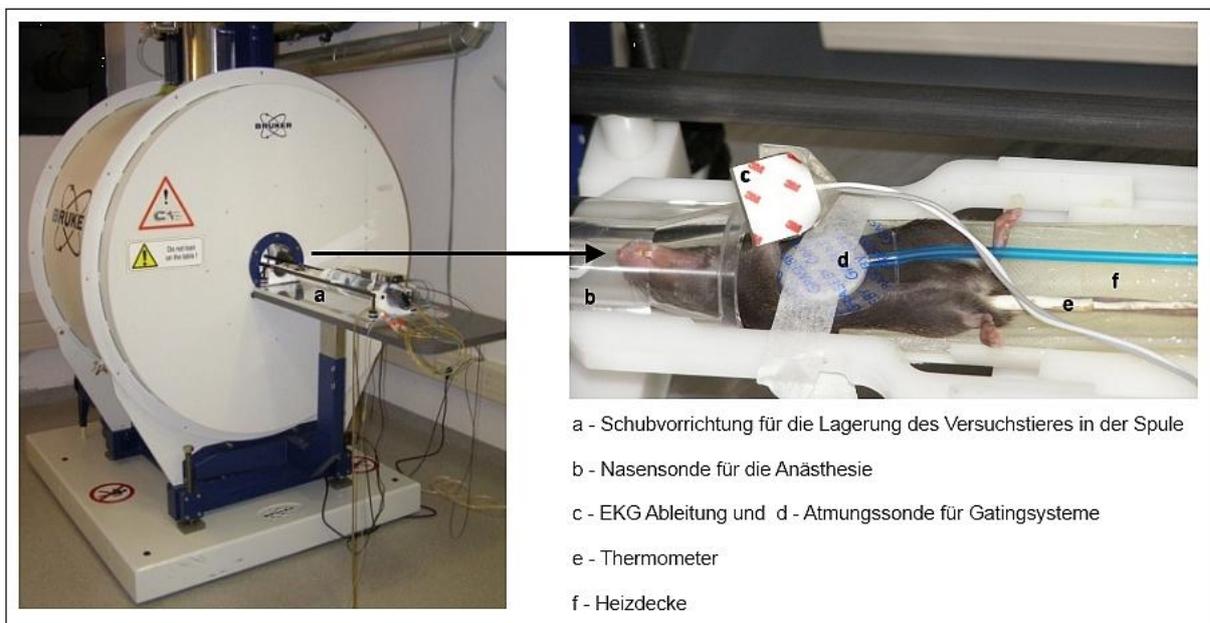


Abb. 8| Abbildung des verwendeten 7-Tesla Kleintier-MRT (links) mit Darstellung der Lagerungsvorrichtung für die Versuchstiere (rechts) und notwendige Komponenten für die Untersuchung der Lunge (Legende a -f).

Zur Reduzierung bewegungsabhängiger Artefakte wurden die Versuchstiere für die Dauer der Aufnahme narkotisiert. Nach der Anästhesieeinleitung mit 2,5% Stickstoffoxid und 1,5 - 2,5% Isofluran konnte eine konstante Ventilation von 0,5 l/min mit einem Sauerstoff-/Stickstoffgemisch (Verhältnis 1:2) über eine Nasensonde aufrechterhalten werden. Die Sicherstellung einer konstanten Körpertemperatur von 37° C erfolgte während der ca. 45-minütigen Untersuchung mit einer beheizbaren Decke, auf der sich die Tiere in Rückenlage befanden.

MRT-fähige *Gating* Systeme (*Small Animal Monitoring & Gating System*) reduzierten Bewegungsartefakte, welche durch die Herzkreislauf- und Atemtätigkeit entstanden. Hierbei wurden EKG-Elektroden sowie ein Atembewegungsmesser am Thorax und an den Vorderpfoten befestigt. Die MRT-Aufnahmen konnten hierdurch mit dem Atemzyklus und der Herzfrequenz synchronisiert werden. Eine anschließende Auswertung der MRT-Aufnahmen erfolgte mithilfe der Software ImageJ. Die Lungengrenzen und die Lungeninfiltrate konnten auf jeder Schnittebene markiert und anschließend sowohl die Gesamtgröße der Lunge als auch der Anteil der Infiltrate durch Addition der einzelnen Flächen errechnet werden. Die gesunden Lungenabschnitte wurden als Referenz für das Hintergrundrauschen markiert. Der Anteil der Infiltrate an der Gesamtfläche der Lunge konnte anschließend ermittelt werden. Ein Signal-Rausch-Verhältnis, das mehr als 3,5% betrug, wurde aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse als Zeichen einer Lungenentzündung gewertet.

3.8.2.2 Untersuchung der bakteriellen Besiedelung der Lunge

Für die Verifizierung der im MRT gemessenen Lungeninfektion wurde die bakterielle Keimlast der Lungen gemäß dem vorhandenen Protokoll von Prass et al. (2003) quantifiziert. Nach der Anästhesie der Mäuse mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) erfolgte eine rasche zervikale Dislokation. Anschließend wurde der Thorax mit 70% Ethanollösung gespült, wodurch eine ausreichende Sterilisation für die Thorakotomie erzielt wurde. Nach Eröffnung des Thorax wurde die Lunge entfernt und diese mit 400 µl einer sterilen PBS-Lösung homogenisiert. 50 µl des Homogenisates wurden auf einer LB Agar Platte in serieller Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei 37° C inkubiert (Stickstoff mit 5% Kohlenstoffdioxid und 20% Sauerstoff). Für die Quantifizierung von Bakterienkolonien (*colony forming units*, CFU) wurden diese am darauffolgenden Tag mit einem Handzähler bestimmt.

3.8.3 Allgemeiner Gesundheitsscore der Maus

Der allgemeine Gesundheitszustand der Versuchstiere wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen überwacht. Hierzu wurde ein Score entwickelt, der typische Indikatoren des Wohlbefindens (Carstens & Moberg 1999) der Tiere beinhaltet (Tabelle 8). Dazu gehören beispielsweise Kriterien wie das Verhalten, Körpergewicht, Kot- und Stuhlzusammensetzung sowie die Körperhaltung der Maus.

Kriterium	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte
Verhalten	wach, aufmerksam, reagiert auf Umgebungsreize	reduzierte Aufmerksamkeit, weniger Interesse an Umwelt, wenige Schritte nach moderater Stimulation	lethargisch, keine Bewegung nach moderater Stimulation, kein Interesse für die Umwelt
Haltung	physiologisch	normal, unsichere Bewegungen, gelegentlich Entlastungshaltungen	gekrümmter Rücken, unsichere Bewegungen, evtl. Zittern
Haut und Haarkleid	Fell glatt, glänzend, anliegend, gründliche Fellpflege	ganzlos, struppig, Fellpflege reduziert	struppiges, glanzloses Fell, keine Fellpflege
Augen	physiologisch, keine Konjunktivitis	Augen offen und klar, aber seröser Augenausfluss	Augen geschlossen/zusammengekniffen, Augen erscheinen trüb, seröser oder muköser Augenausfluss
Atmung	normal, keine Auffälligkeiten	seröser Nasenausfluss	verschärfte Atmung, Nasenausfluss, evtl. Anzeichen von Hyperventilation
Gastrointestinaltrakt	normale Kotkonsistenz	weiche Kotkonsistenz	Diarrhö
Körpertemperatur	35° C - 39° C	33° C - 35° C oder 39° C - 40° C	<33° C oder >40° C
Körpergewicht	stabil	5 - 10% Abnahme	>10% Abnahme
Insgesamt	minimal 0 Punkte		maximal 16 Punkte

Tabelle 8| Übersicht bezüglich der Kategorien und Punkteverteilung des allgemeinen Gesundheitsscores der Maus. Für diese Wertung wurden die wichtigsten Parameter verwendet, die sowohl äußerliche als auch innere Hinweise über den Gesundheitszustand liefern.

Die Untersuchungen wurden täglich zur gleichen Uhrzeit durchgeführt, um mögliche zyklusbedingte Schwankungen des Verhaltens auszuschließen. Dem Untersucher war zu keiner Zeit des Experiments die Gruppenzuteilung des jeweiligen Versuchstieres bekannt. Der Score reicht von 0 (gesundes Tier) bis 16 Punkten (sehr krankes Tier). Ab einem Wert von 5 - 6 Punkten lag eine wesentliche Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Tieres vor und kann auf eine Infektion oder andere Beeinträchtigungen des Tieres hinweisen.

3.9 Statistische Analyse

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel (\pm), Standardabweichung (SD) oder bei ordinalen Werten als Median (\pm) angegeben. Die grafische Darstellung erfolgte in Box-Whisker-Plots mit Angabe des Minimums und Maximums. Für die Analyse der Daten wurde SPSS 14.0 und SPSS Statistik 18.0 für Windows verwendet.

Die Normalverteilung der Variablen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Nicht normal verteilte Daten sind mittels Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Test für paarweise Vergleiche oder Mann-Whitney-U-Test analysiert worden. Für die Analyse fand der Student's t-Test und ANOVA mit einer Bonferroni-Korrektur Anwendung. Um p-Werte zu berechnen, wurde der parametrische Student's t-Test angewendet. Ein p-Wert kleiner als 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Ein Fehler 1. Art (α) von 0.05 und ein Fehler 2. Art (β) von 0.2 wurden für die Hypothesentestung akzeptiert.

Die Kalkulation der Effektstärke und der *a priori* Stichprobengröße wurde mit dem Programm G*Power 3.1.2 für Windows (Faul et al. 2007) durchgeführt. Eine Verbesserung des Ergebnisses um 50% wurde als relevanter Effekt angesehen. Verglichen wurden hier einzelne Gangparameter der jeweiligen Behandlungsgruppen. Mögliche Zusammenhänge zwischen dem Körpergewicht des Versuchstieres und der maximalen Kontaktfläche einer Pfote bei der Ganganalyse wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (*Spearman's Rho*) beurteilt.

Heterogene Daten wurden nach der Methode von Matthews und Altman (Matthews & Altman 1996) hinsichtlich der Effektstärke untersucht. Ein Vergleich von Methoden mit verschiedenen Einheiten (beispielsweise hier der Vergleich zwischen der radiologischen Diagnostik einer Pneumonie: Lungeninflammation in Prozent und dem Standardverfahren in koloniebildenden Einheiten; CFU) wurden nach dem Prinzip von Bland und Altman (Bland & Altman 1986; Bland M. 2004) durchgeführt. Es wurde nach einer Wahrscheinlichkeit von 95% gesucht, mit der die alten Werte mit der neuen Methode vorhergesagt werden konnten. Die Methode nach Kaplan

und Meier diente zur Berechnung der Überlebensfunktion und wurde in einer Überlebenskurve grafisch dargestellt. Für den Gruppenvergleich der Überlebenszeitanalyse wurde der Log-Rang-Test (*log-rank test*) durchgeführt, um die verschiedenen Therapieansätze zu vergleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Neue Methoden

4.1.1 Die Ganganalyse als geeignetes Messverfahren für neurologische Parameter

4.1.1.1 Schlaganfallsensitive Parameter

In dieser Teilstudie, zur Untersuchung der Gangparameter als mögliches Beurteilungskriterium für das neurologische Ergebnis im Mausmodell, konnten verschiedene schlaganfallsensitive Veränderungen festgestellt werden, die im Folgenden aufgeführt werden.

Zunächst wurde jedoch eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch eine veränderte Laufgeschwindigkeit oder ein verändertes Gewicht der Versuchstiere nach dem Schlaganfall untersucht. Das Gewicht der Tiere war am Tag der Ganganalyse (10. Tag) mit 22.31 ± 1.64 g gegenüber dem Ausgangsgewicht vor der MCAO von 23.37 ± 1.53 g verringert (*Student's t-test*, $t(60) = 2.620$, $p = 0.011$). Das Körpergewicht korrelierte jedoch mit keinem der gemessenen Gangparameter. Im Vergleich zur Ausgangsgeschwindigkeit (2.439 ± 0.663 s) waren die Mäuse nach dem Schlaganfall langsamer (2.793 ± 0.553 s, $p = 0.026$, Abbildung 9a). Die zeitabhängigen Parameter der Ganganalyse (bspw. *swing speed*) wurden daher zum Ausschluss eines möglichen Bias erst nach einer mathematischen Korrektur der Geschwindigkeitsänderung analysiert (Multiplikation mit der Laufdauer, bspw. *swing speed x run duration*).

Die maximale Kontaktfläche (*maximum contact area*) der rechten Vorderpfote (*Student's t-test*, $t(60) = 2.092$, $p = 0.041$) sowie der rechten Hinterpfote (*Student's t-test*, $t(60) = 5.710$, $p < 0.0005$) war signifikant verringert. Ebenfalls signifikant vermindert war die maximale Kontaktfläche der linken Hinterpfote (*Student's t-test*, $t(60) = 4.084$, $p = 0.001$; Abbildung 9b).

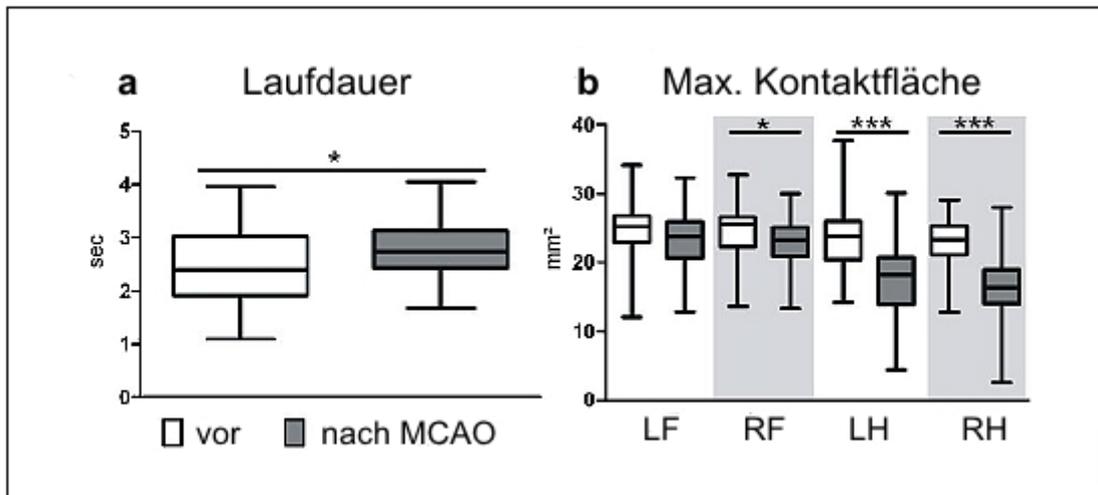


Abb. 9| (a) Die Laufdauer war am 10. Tag nach dem Schlaganfall verändert, die Tiere bewegten sich langsamer fort ($p = 0.026$; graue Box). (b) Die maximale Kontaktfläche der beiden Hinterpfoten verringerte sich signifikant, in der rechten Vorderpfote wurde ebenfalls eine leichte Änderungen beobachtet (*Student's t-test*; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Die Entfernung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schritten der rechten (*Student's t test*, $t(60) = 2.885$, $p = 0.005$) sowie linken Hinterpfote (*Student's t-test*, $t(60) = 2.883$, $p = 0.005$) war nach dem Schlaganfall kürzer als in der gleichen Kohorte vor der MCAO (Abb. 10b). Die Schrittlänge (*stride length*) der beiden Vorderpfoten wurde hingegen nicht beeinflusst.

Die Schwenkgeschwindigkeit (*swing speed*) beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich eine Pfote von einem Schritt bis zum nächsten Schritt fortbewegt. In dieser Zeit hat die jeweilige Pfote keinen Kontakt mit der Bodenfläche. Um ein mögliches Bias dieses Wertes durch die individuelle Laufgeschwindigkeit des Tieres zu vermeiden, wurde die Entfernung, die die Maus mit der jeweiligen Pfote über den gesamten Laufdurchgang zurücklegt, berechnet (*swing speed x run duration*). Verglichen mit den gesunden Mäusen vor dem Schlaganfall reduzierte sich die Laufgeschwindigkeit der rechten (*Student's t-test*, $t(60) = 4.420$, $p < 0,0005$) und linken Hinterpfote (*Student's t-test*, $t(60) = 2.943$, $p = 0.005$; Abb. 10b).

Zusammengefasst demonstrieren die erhobenen Daten, dass vor allem die hinteren Extremitäten nach der Ischämie betroffenen sind, mit besonderer Betonung der rechten Hinterpfote, bei einem linksseitigen Schlaganfall. Die maximale Kontaktfläche der Pfoten, die Schrittlänge sowie die normalisierte Schwenkgeschwindigkeit verringerten sich nach einer zerebralen Ischämie signifikant.

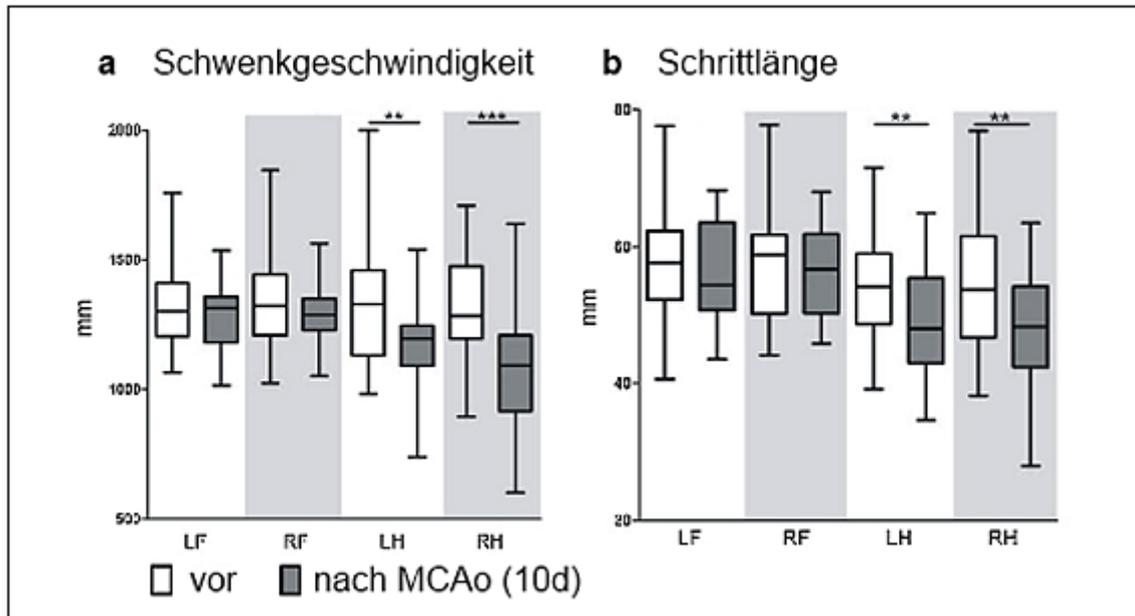


Abbildung 10 | Dargestellt sind die (a) normalisierte Schwenkgeschwindigkeit (Geschwindigkeit x Laufdauer) und die (b) Schrittlänge vor und 10 Tage nach dem experimentellem Schlaganfall. Beide Hinterpfoten zeigen Defizite bei der Ausübung der Fortbewegung (*Student's t-test*; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Unter normalen Bedingungen zeigen die Mäuse ein reguläres Schrittfolgemuster als Zeichen einer gesunden Koordinationsfähigkeit. Ein Schlaganfall beeinträchtigt diese und führt zu einer irregulären Schrittfolge der Maus, sodass der Regularitätsindex zwischen den einzelnen Pfoten nach der MCAO deutlich verringert war (*Student's t-test*, $t(60) = 2.879$, $p = 0.006$; Abb. 11).

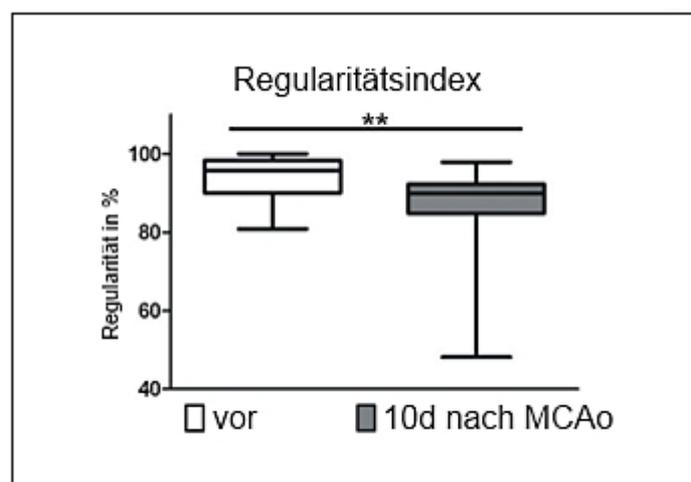


Abb. 11 | Im Vergleich mit dem Laufverhalten vor dem Schlaganfall zeigte sich am 10. Tag nach der MCAO ein signifikant verringerter Regularitätsindex. Für den Vergleich mit der Performance vor dem Schlaganfall wurden die gleichen Versuchstiere untersucht. Interindividuelle Unterschiede des Gangbildes wurden somit deutlich minimiert.

Ein weiterer Parameter der Koordination ist die sogenannte Phasendispersion, die die Stellung von zwei Pfoten während eines Zyklus zueinander beschreibt (jeweils definiert als Festpunkt- und Zielpfote, „*anchor paw*“ und „*target paw*“, Abb.12). Die Untersuchung der Koordination diagonalen Gliederpaare, also beispielsweise der Laufabfolge von linker Vorderpfote zur rechten Hinterpfote (LF-RH) oder von rechter Vorderpfote zur linken Hinterpfote (RF-LH), ergab eine verlängerte Kontaktzeit der Pfoten mit der Glasfläche (*Student's t-test*, $t(54) = -5.311$, $p < 0.0005$ für LF-RH; *Student's t-test*, $t(56) = -4.141$, $p < 0.0005$ für RF-LH) verglichen mit den Werten der gesunden Mäuse vor der MCAO (Abbildung 12a).

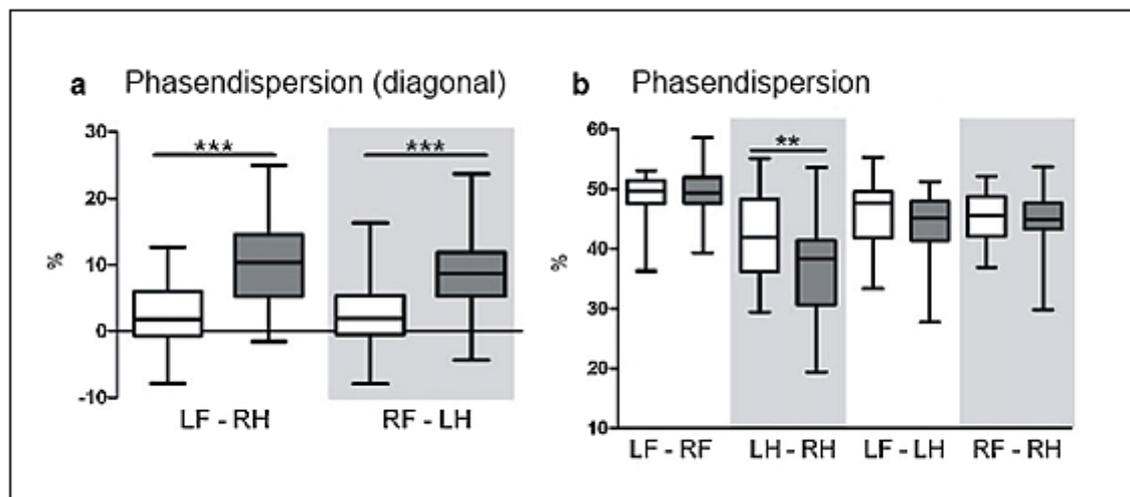


Abb. 12 | Die Koordination zwischen den Gliederpaaren, die sog. Phasendispersion ist nach dem Schlaganfall beeinträchtigt. Es ergaben sich hoch signifikante Werte bei der (a) Phasendispersion der diagonalen Gliederpaare und bei der (b) Phasendispersion des Beckengürtels (Hinterpfoten).

Die Ischämie beeinträchtigt die Koordination zwischen linker und rechter Hinterpfote. Dies wird unter anderem durch das verkürzte Zeitintervall des Kontaktes mit der Bodenfläche deutlich (*Student's t-test*, $t(60) = 3.170$, $p < 0.002$). Die Koordination zwischen den jeweils ipsilateralen Paaren, beispielsweise zwischen linker Vorder- und Hinterpfote, und die Koordination zwischen beiden Vorderpfoten wurde durch den Schlaganfall nicht verändert (Abb. 12 b).

Im Einklang mit den Änderungen der Parameter einzelner Pfoten konnten Irregularitäten der normalen Schrittfolgemuster als auch der generellen Koordination zwischen diagonalen Gliederpaaren (LV-RH und RV-LH) beobachtet werden. In der nachfolgenden Tabelle 9 ist eine Übersicht relevanter schlaganfallsensitiver Gangparameter sowie deren Definition zusammenfassend aufgeführt.

Parameter	Pfote		MW \pm SD vor MCAO	MW \pm SD nach MCAO	<i>p</i>	<i>d</i>	
(a) Räumliche Parameter							
<i>Max. Contact Area</i> (mm ²)	RF	*	25.00 \pm 4.248	22.75 \pm 4.231	0.041	0.54	
	RH	***	23.43 \pm 3.710	16.98 \pm 5.086	<0.0005	1.46	
	LF		24.95 \pm 4.055	23.53 \pm 4.833	0.214	0.32	
	LH	***	23.42 \pm 5.462	18.41 \pm 5.746	0.001	0.89	
<i>Max. Intensity</i> (%)	RF		114.7 \pm 9.990	113.2 \pm 10.39	0.554	0.15	
	RH	***	142.9 \pm 12.81	125.6 \pm 22.68	<0.0005	0.98	
	LF		115.2 \pm 9.011	115.4 \pm 11.81	0.942	0.01	
	LH	**	141.0 \pm 11.46	127.7 \pm 23.61	0.007	0.70	
(b) Kinetische Parameter							
<i>Run duration</i> (s)		*	2.439 \pm 0.663	2.793 \pm 0.553	0.026	0.62	
<i>Normalized swing speed</i> (s)	RF		1335 \pm 171.4	1323 \pm 198.0	0.798	0.06	
	RH	***	1311 \pm 180.2	1102 \pm 193.9	<0.0005	1.12	
	LF		1316 \pm 157.3	1294 \pm 112.4	0.532	0.16	
	LH	**	1368 \pm 309.2	1180 \pm 175.7	0.005	0.78	
<i>Stand</i> (s)	RF	***	0.132 \pm 0.030	0.163 \pm 0.033	<0.0005	0.94	
	RH		0.133 \pm 0.030	0.133 \pm 0.035	0.996	0.01	
	LF	***	0.133 \pm 0.032	0.161 \pm 0.033	0.001	0.87	
	LH		0.137 \pm 0.034	0.145 \pm 0.037	0.346	0.35	
(c) Relative Gangparameter							
<i>Stride length</i> (mm)	RF		57.58 \pm 8.163	56.08 \pm 7.541	0.456	0.02	
	RH	**	54.92 \pm 9.718	48.07 \pm 8.973	0.005	0.78	
	LF		57.42 \pm 8.152	56.06 \pm 7.588	0.500	0.13	
	LH	**	55.08 \pm 8.772	49.02 \pm 7.744	0.005	0.72	
<i>Base of support</i> (mm)	RF-LF	*	11.93 \pm 7.297	8.226 \pm 6.222	0.036	0.51	
	RH-LH	*	22.07 \pm 14.14	14.55 \pm 10.52	0.021	0.62	
<i>Print positions</i>	RF-RH		10.15 \pm 4.431	12.45 \pm 6.331	0.102	0.49	
	LF-LH		9.569 \pm 5.045	10.73 \pm 6.039	0.414	0.22	
<i>Duty cycle</i> (%)	RF	*	53.34 \pm 3.764	55.58 \pm 3.380	0.016	0.72	
	RH	**	53.66 \pm 5.098	49.68 \pm 5.527	0.005	0.79	
	LF	*	53.00 \pm 3.256	55.16 \pm 3.773	0.019	0.56	
	LH		55.25 \pm 6.049	53.17 \pm 5.074	0.147	0.41	
(d) Koordinationsparameter							
<i>Phase dispersion</i> (%)	<i>diag.</i>	RF > LH	***	1.606 \pm 5.189	7.866 \pm 6.321	<0.0005	1.12
		LF > RH	***	2.407 \pm 5.371	10.32 \pm 5.758	<0.0005	1.45
	<i>girdle</i>	LH > RH	**	43.05 \pm 7.401	37.02 \pm 7.581	0.002	0.82
		LF > RF		48.71 \pm 3.602	48.62 \pm 3.895	0.931	0.01
	<i>lat.</i>	RF > RH		45.75 \pm 4.199	44.80 \pm 5.978	0.470	0.25
		LF > LH		45.96 \pm 5.299	44.16 \pm 5.601	0.199	0.31
<i>Regularity index</i> (%)	alle	**	93.12 \pm 5.965	87.40 \pm 9.306	0.006	0.73	

Tabelle 9 | Übersicht schlaganfallsensitiver Gangparameter mit Angabe des Mittelwerts (MW), Standardabweichung (SD), p-Wert (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001) und der Cohen-Effektgröße (*d*). Die Phasendispersion beinhaltet Werte für diagonale (*diag.*), Schulter- bzw. Beckengürtel (*girdle*) und laterale (*lat.*) Gliederpaare.

4.1.1.2 Bestimmung des Infarktvolumens

In einer Teilgruppe der Versuchstiere aus dieser Teilstudie wurde ein MRT des Kopfes durchgeführt (Abbildung 13), um neben dem Bederson Score einen bildmorphologischen Nachweis einer erfolgreichen Schlaganfalloperation zu erhalten. Sowohl das Striatum als auch der Kortex waren mit einem mittleren Infarktvolumen von 18,1% (nach Ödemkorrektur; SD 4.9; n = 10) der rechten Hemisphäre betroffen. Das Resultat spricht für eine erfolgreich durchgeführte MCAO.

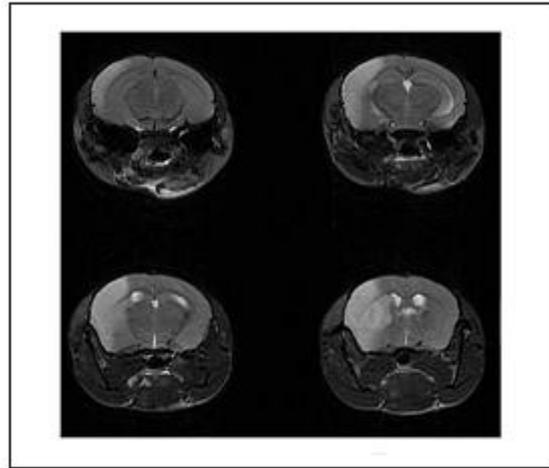


Abb. 13 | Charakteristisches T2-gewichtetes MRT eines Mausgehirnes am 1.Tag nach der MCAO. Das hyperintense Infarktareal der rechten Hemisphäre ist in allen dargestellten Schichten gut zu erkennen.

4.1.1.3 Analyse der Anwendbarkeit

Der experimentelle Schlaganfall beeinflusst im Mausmodell etliche Gangparameter (Hetze et al. 2012). Um die Anwendbarkeit der Ganganalyse zu testen, wurde eine Modellkalkulation durchgeführt, bei der die Wirksamkeit eines willkürlich angenommenen Neuroprotektivums (Substanz X) untersucht worden ist. Bei dieser Kalkulation wurde prinzipiell angenommen, dass einerseits die Verbesserung des Ergebnisses um 100% ein unerreichbares Ziel darstellt, andererseits jedoch eine geringe Verbesserung von beispielsweise 20% nicht relevant genug ist. Mathematisch wurde daher eine Verringerung neurologischer Defizite um 50% durch eine Substanz X für dieses Experiment als realistisch angesehen.

Die Phasendispersion wird an dieser Stelle als Parameter für die Beurteilung unterschiedlicher statistischer Methoden zur Analyse von Verhaltensdaten verwendet. Wie oben beschrieben, änderte sich dieser Parameter von $2,4 \pm 5,4\%$ auf $10,3 \pm 5,7\%$ nach dem experimentellen Schlaganfall, resultierend in einer berechneten mittleren Phasendispersion von $6,5\% (\pm 5,5)$ der mit Substanz X behandelten Tiere. Die Effektgröße (nach Cohen 1988) für die drei genannten

Gruppen ist $f = 0.6$. Dies stellt per Definition einen starken Effekt dar. Ermittelt man die erforderliche Gruppengröße mit der Voraussetzung, dass $\alpha = 0.05$ (Spezifität) und $\beta = 0.8$ (*Power*) ist, so ergibt sich ein kritisches $F = 3.24$ und eine benötigte Gruppengröße von 45, d.h. 15 Tiere pro Behandlungsgruppe. Dies entspricht einer allgemein üblichen Gruppengröße für Schlaganfallstudien. Diese Berechnungen treffen jedoch nur für den Vergleich von drei Behandlungsgruppen zu. Normalerweise haben Neuroprotektionsstudien das Ziel, ein Verum einem Placebo gegenüberzustellen. Die Effektgröße des Vergleiches von Placebo und der Grundlinie (*Baseline*) ist mit $d = 1.5$ relativ groß. Zwischen dem Placebo und der Substanz ist diese mit einem Wert von $d = 0.75$ jedoch erheblich kleiner und spricht für einen mittelgroßen Effekt. Daher würde man nur 8 Tiere pro Gruppe benötigen, um einen signifikanten Unterschied zwischen der Grundlinie und dem Placebo zu demonstrieren ($\alpha = 0.05$; $\beta = 0.8$; *two-tailed test*); jedoch 30 Tiere, um einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungskonzepten zeigen zu können (*Student's t-test*). Um mit der kleineren Gruppengröße auszukommen, können daher die Behandlungsmethoden auch gegen die *Baseline* verglichen werden. Bei diesem Vorgehen zeigte sich, dass nur in der Placebogruppe signifikante Veränderungen des Gangbildes auftraten. Es muss an dieser Stelle bedacht werden, dass diese Resultate irreführend sein können, da der p-Wert von der Effektgröße und von der Präzision der Abschätzung des erwarteten Effektes (Standardfehler) abhängig ist. Das bedeutet, dass ohne die Einbeziehung aller Informationen, wie Effektgröße, Gruppengröße und Verteilung, falsch positive Schlüsse gezogen werden könnten. In dieser Modellkalkulation konnte ein signifikanter Unterschied der Effektgröße zwischen Placebo und Substanz X beobachtet werden. Als Konsequenz ergibt sich die Notwendigkeit eines statistischen Testes, der als Nullhypothese annimmt, dass die Effektgrößen in beiden Gruppen gleich sind. Matthews & Altman (1996) haben eine geeignete Methode beschrieben, die auf den Unterschieden zwischen den Therapieoptionen und dem Standardfehler dieses Unterschiedes basiert. Verwendet man dieses Verfahren, so ergibt sich für diese Studie ein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Substanz X (Tabelle 8). Um die benötigte Gruppengröße zu ermitteln, verwendet man zunächst eine Formel für die Teststatistik, bei der x_1 und x_2 die Unterschiede vor und nach dem Schlaganfall der jeweiligen Gruppe und se_i der dazugehörige Standardfehler der Differenz darstellen:

$$(1) \quad Z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{se_1^2 + se_2^2}$$

Ersetzt man die x-Werte durch die Differenzen und fügt

$$(2) \quad se_{diff} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

für die entsprechenden Standardfehler der Differenzen s^2 als Varianz und n als Gruppengröße ein, so kann das Gleichungssystem nach n aufgelöst werden, angenommen, dass n in allen Gruppen gleich ist ($n_1 = n_2 = n$):

$$(3) \quad n = \frac{s_{vorher}^2 + s_{Placebo}^2 + s_{vorher}^2 + s_x^2}{((x_{vorher} - x_{Placebo}) - (x_{vorher} - x_x) / z)^2}$$

Für signifikante Werte muss z per Definition für zweiseitige Tests (*two-sided test*) größer als 1.96 oder kleiner als -1.96 sein. Als Resultat ergibt sich eine benötigte Gruppengröße von 21 Versuchstieren für eine Verbesserung des Ergebnisses um 50%, 16 für eine 60% Verbesserung und 12 für eine Besserung um 70%. Falls nur die Verbesserung des Resultates von Interesse ist, beispielsweise für die Testung von neuroprotektiven Medikamenten, kann dieser Test auch als einseitiger Test (*one-sided test*, z dann < -1.65 oder > 1.65) angewendet werden, mit dem Ziel, die nötige Stichprobengröße weiter reduzieren zu können (Bland & Altman 1994).

Gruppe	Placebo		Substanz X	
	vorher	nachher	vorher	nachher
Schlaganfall				
Mittelwert	2.4	10.3	2.4	6.35
SE	0.96	1.03	0.96	1.03
Gruppengröße	31	31	31	31
Effekt	10.3 – 2.4 = 7.9		6.35 – 2.4 = 3.95	
SE _{diff}	1.41		1.41	
Differenz zw. Placebo/ Substanz X			3.95	
Z			1.98 → P < 0.05	

Tabelle 10 | Beispielkalkulation der Phasendispersion (LF-RH) zum Vergleich der Effektgrößen. Die Substanz X ist ein willkürlich gewähltes Medikament, das in dieser Berechnung das Ergebnis um 50% verbessert (zweiseitiger Test).

4.1.2 Die MRT als neue Methode für die Diagnose einer Pneumonie im Mausmodell

Die bisherige Methode zur Pneumonie-Diagnostik an Mäusen bestand aus einer histologischen Untersuchung der entnommenen Lunge sowie der anschließenden bakteriellen Quantifizierung. Für *In-vitro*-Modelle stellt dies kein Problem dar. In dieser Studie ergab sich jedoch die Notwendigkeit, die Effekte verschiedener Behandlungskonzepte hinsichtlich ihres Langzeitresultates in einem *In-vivo*-Experiment untersuchen zu können. Daher sollte die Eignung eines bildgebenden Verfahrens bezüglich der Diagnose einer Lungenentzündung untersucht werden. Auf Grundlage einer Studie nach Sheth et al. (2008) wurde die Lunge nach einem experimentellen Schlaganfall mittels MRT untersucht. Die Methode basiert auf der Messung hyperintenser Areale als Ausdruck einer Entzündung und bakterieller Infiltration der Lunge. Die bildmorphologisch pathologischen Signale werden anteilig an der gesamten Lunge in Prozent ausgedrückt. Ein Beispiel einer typischen MRT-Sequenz ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

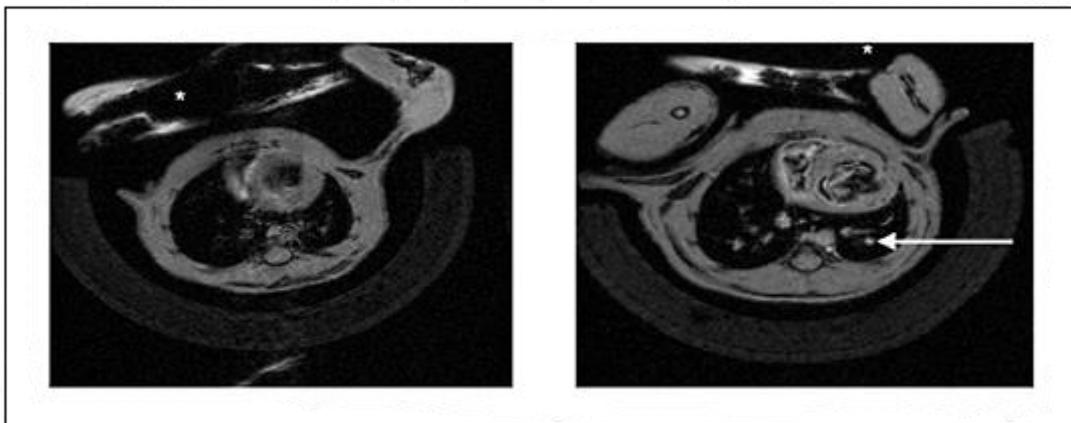


Abb. 14 T1-gewichtete MRT-Sequenz einer erkrankten Maus (rechts) im Vergleich mit der Lunge einer gesunden Maus (links). Im rechten Bild sind hyperintense Areale (Pfeil), die eine bakterielle Infiltration des Lungenparenchyms darstellen, deutlich zu sehen.

Drei Tage nach dem experimentellen Schlaganfall zeigten sich die Lungen von erkrankten Mäusen mit einer hyperintensiven Fläche von 6 - 7% des totalen Lungenvolumens, wohingegen gesunde Mäuse in einem Bereich von weniger als 3% lagen. Zur Überprüfung der Richtigkeit dieser Beobachtungen wurden die Lungen derselben Tiere entnommen und mikrobiell untersucht. Die Ergebnisse der Quantifizierung bakterieller Besiedlung in der Lunge (*colony forming units*, CFU) wurden mit den zuvor erhobenen Werten der Bildgebung mittels MRT verglichen. Es zeigte sich eine signifikante, lineare Regression zwischen der bakteriellen Besiedlung der Lunge und der Ergebnisse des MRT (*Pearson's R* = 0.893, $R^2 = 0.704$; $y = 0.594x$; $SE = 0.107$; $p < 0.001$, Abb. 14). Die Vorhersage der bakteriellen Belastung (CFU)

aus dem untersuchten Lungenhomogenisat mit den MRT Ergebnissen liegt im 95%-Konfidenzintervall. Die MRT Bildgebung ist somit eine zuverlässige und aussagekräftige Methode zur Diagnose einer bakteriellen Pneumonie in einem *In-vivo*-Modell der Maus.

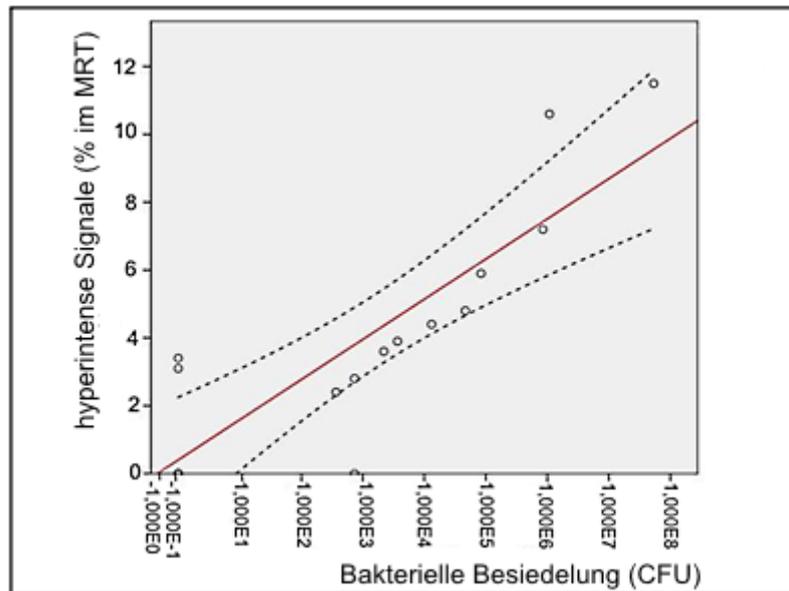


Abb. 15 Grafische Darstellung der Korrelation zwischen dem Goldstandard und der hier untersuchten neuen Methode (MRT) zur Diagnose einer bakteriellen Infektion der Lunge. Es zeigte sich eine signifikante lineare Regression. Die Ergebnisse liegen im 95%-Konfidenzintervall.

4.2 Effekte einer präventiven Antibiotikatherapie auf verschiedene Parameter im Mausmodell des Schlaganfalls

4.2.1 Analyse der Letalitätsrate

Die Sterblichkeit der mit dem Placebopräparat (NaCl) behandelten Mäuse ist mit einer Rate von 45% relativ hoch. Die Überlebensrate war hingegen bei der präventiven Behandlungsgruppe mit 81% respektive bei 88% in der Standardgruppe signifikant höher (Abbildung 16, PAT *versus* Placebo $p = 0.03$, Standard *versus* Placebo $p = 0.007$, Kaplan-Maier Analyse der Sterblichkeit). Beide antibiotischen Behandlungskonzepte erwiesen sich bezüglich einer Steigerung der Überlebenswahrscheinlichkeit als gleichwertig (PAT *versus* Standard $p = 0.44$). Generell konnte die antibiotische Behandlung mit Enrofloxacin die Sterblichkeit deutlich senken. In der nachfolgenden Abbildung 16 ist die Überlebensrate der jeweiligen Behandlungsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum abgebildet.

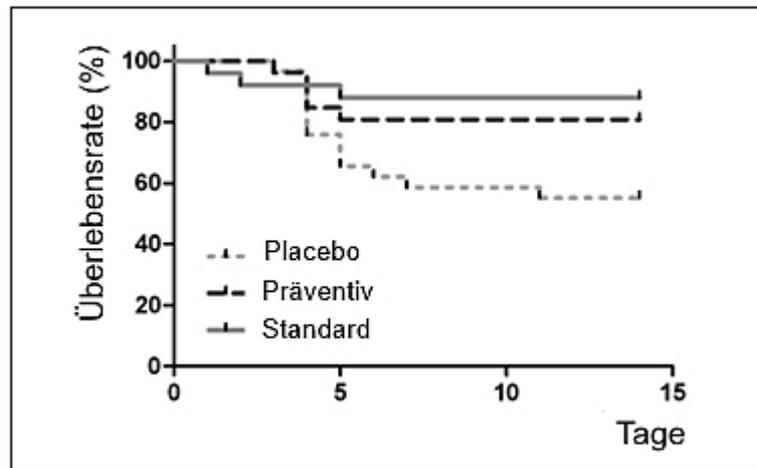


Abb. 16 | Kaplan Meier Analyse der Überlebensrate. Die Sterblichkeit ist in der Placebogruppe (graue, unterbrochene Linie) zwischen dem 3. und 7. Tag nach dem Schlaganfall am höchsten. Die präventive Behandlung mit Enrofloxacin (schwarze, unterbrochene Linie) als auch die Standardbehandlung (graue Linie) verbesserte die Überlebensrate signifikant gegenüber dem Placebo (n = 80, Präventivgruppe versus Placebo p = 0.03; Standardgruppe versus Placebo p = 0.007).

4.2.2 Häufigkeitsverteilung der Pneumonie

Die MRT Aufnahmen der Lunge zeigten einen Anteil hyperintenser Bereiche von $6,8 \pm 1,1\%$ (Durchschnitt \pm SD) in der Placebogruppe bzw. $6,3 \pm 1,5\%$ in der Standardtherapiegruppe.

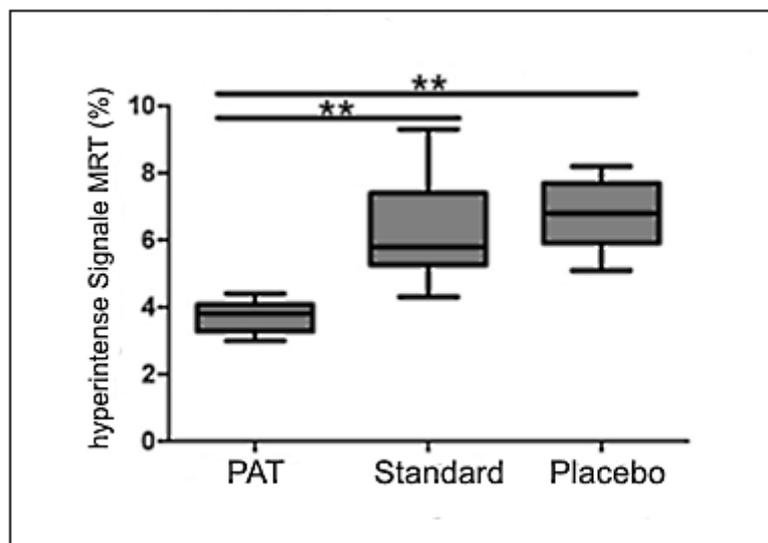


Abb. 17 | Im Vergleich zur Standardbehandlung (n = 13) als auch zu der Placebobehandlung (n = 9) wies die präventive antibiotische Therapie (PAT; n = 10) signifikant reduzierte Anzeichen einer Lungeninfektion in der kernspin-tomografischen Bildgebung auf (Varianzanalyse mit Bonferroni *post - hoc* Analyse; PAT vs. Standard p < 0.001, PAT vs. Placebo p < 0.001, Standard vs. Placebo nicht signifikant).

Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere der präventiven Behandlungsgruppe signifikant reduzierte Anzeichen für eine Inflammation der Lunge von $3,7 \pm 0,4\%$ auf ($n = 32$, ANOVA mit Bonferroni *post-hoc*; PAT vs. Standard $p < 0.001$; PAT vs. Placebo $p < 0.001$; Standard vs. Placebo nicht signifikant, Abb. 17). In der Zusammenschau zeigte sich, dass nur die präventive Antibiotikatherapie eine Lungenentzündung verhindern konnte.

4.2.3 Objektivierbare Gesundheitsparameter im Verlauf

Die Mäuse wurden mit dem beschriebenen allgemeinen Gesundheitsscore täglich überwacht. Im Median erholten sich die Versuchstiere der präventiven Behandlungsgruppe komplikationslos ab dem 6. Tag nach dem Schlaganfall (Abb. 18). Die Tiere aus der Standardgruppe benötigten ca. 2 Tage mehr, um sich zu rehabilitieren, während sich in der Placebogruppe auch noch am Ende des Versuches, an den Tagen 12 und 13 nach der MCAO, Beeinträchtigungen zeigten.

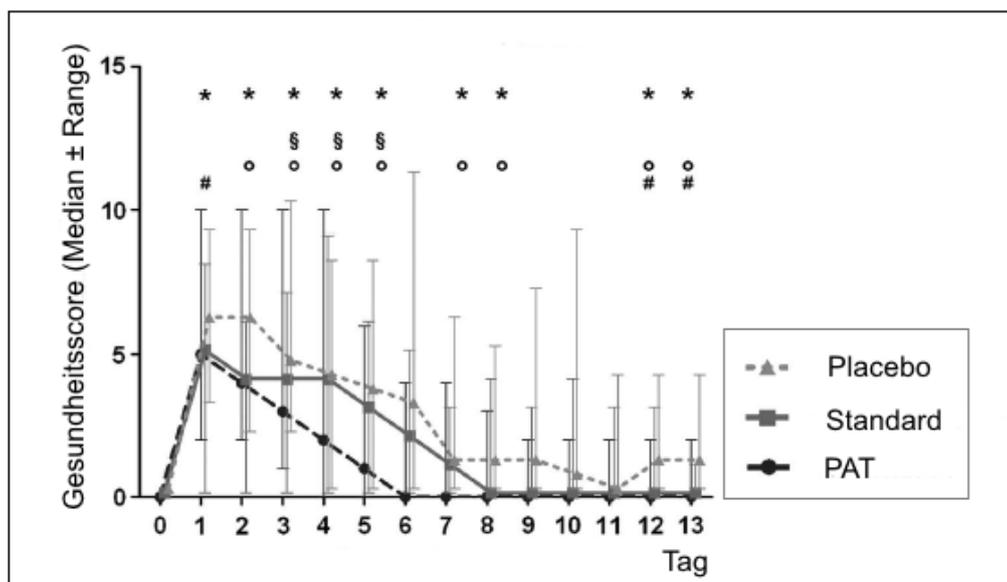


Abb. 18 | Der Gesundheitsscore wurde täglich gemessen. Präventiv behandelte Tiere erholten sich insgesamt schneller. Sowohl die Standard- als auch die präventive Behandlungsgruppe zeigten, verglichen mit dem Placebo, ein besseres Langzeitresultat. (Kruskall-Wallis-Test $*p < 0.05$; Dunn's Post-hoc $p < 0.05$ zwischen § PAT vs. Standard; ° PAT vs. Placebo; # Standard vs. Placebo).

Hinsichtlich des Gewichtsverlustes ergab sich am 3. Tag nach dem Schlaganfall kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($20,8 \text{ g} \pm 8\%$). Jedoch erholten sich die mit einem präventiven Antibiotikum behandelten Tiere früher als jene aus der Placebo- oder Standardgruppe. Dies führte zu einem signifikanten Unterschied in den letzten 4 Tagen des Untersuchungszeitraumes (Abb. 19; Tag 10 - 13, Kruskall-Wallis-Test $p < 0.05$).

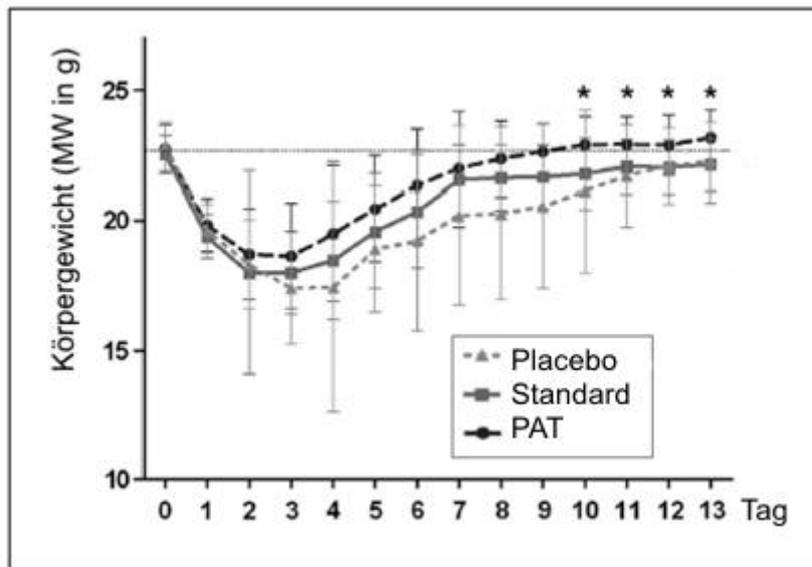


Abb. 19 | Das Körpergewicht der Versuchstiere im Verlauf. Das Ausgangsgewicht aller Tiere betrug im Durchschnitt 22,7 g (durchgehend gestrichelte Linie). Ab dem 10. Tag nach der MCAO ergaben sich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede. Die präventiv behandelten Tiere erholten sich schneller im Vergleich zur Standard- und Placebogruppe (Tag 10 - 13, Kruskal-Wallis-Test $p < 0.05$).

4.2.4 Korrelation zwischen dem Gesundheitsscore und den MRT-Resultaten

Eine Pneumonie wurde im Median am 4. Tag nach der MCAO mit Hilfe des MGHS diagnostiziert und mittels MRT bestätigt. Dementsprechend begann die Standardtherapie durchschnittlich 4,7 Tage nach dem Schlaganfall (*Range*: 4 - 6 Tage nach MCAO). Obwohl sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Gesundheitsscore und den Anzeichen einer Infektion im Lungen-MRT zeigte (*Tag 3*: Spearman's Rho $\rho = 0.400$, Signifikanz $p = 0.023$; *Tag 4*: Spearman's Rho $\rho = 0.523$, Signifikanz $p = 0.004$; *Tag 5*: Spearman's Rho $\rho = 0.431$, Signifikanz $p = 0.031$), konnte in einigen Fällen hingegen eine hohe Infiltrationsrate der Lunge trotz eines relativen geringen Gesundheitsscores (MGHS < 5 Punkte) festgestellt werden. Fast alle Mäuse der Standard- und Placebogruppe zeigten ein erhöhtes Signal im MRT (*Cut-off*-Wert $\geq 5\%$) als Zeichen einer Pneumonie, lediglich 2 Tiere der Standardgruppe zeigten eine Infiltrationsrate von 4,3% und 4,8%. Jedoch zeigten die Tiere der Standardtherapie 2 Tage nach dem MRT klinische Symptome einer Infektion im Gesundheitsscore (> 5 Punkte). Aus der Standard- und Placebogruppe erreichten wiederum 31% der Tiere den klinischen *Cut-off*-Wert nicht (MGHS > 5), obwohl die meisten dieser Mäuse in der MRT-Bildgebung deutliche Anzeichen einer Lungeninfektion aufwiesen.

4.2.5 Auswertung der neurologischen Parameter

Die Tiere der Placebogruppe wiesen im Vergleich zu den anderen beiden Behandlungskonzepten die schlechtesten Resultate im Gangverhalten auf. Dies traf unter anderem für den Parameter der maximalen Kontaktfläche zu: Verglichen mit der Performance vor dem Schlaganfall war die maximale Kontaktfläche der Hinterpfoten in Gegenüberstellung mit den präventiv behandelten Tieren signifikant verringert, jedoch nicht im Vergleich mit den Mäusen der Standardgruppe (Vergleich der Effektgröße, $p < 0.05$, Abb. 20a). Der größte Effekt war insbesondere bei der rechten Hinterpfote (nach linksseitiger MCAO) zu beobachten. Diese Beobachtungen treffen auch auf den Parameter der Schwenkgeschwindigkeit zu (Geschwindigkeit einer Pfote zwischen einem Kontakt bis zum nächsten Kontakt mit der Glasfläche). Hier war ebenfalls die rechte Hinterpfote bei den mit dem Placebo behandelten Tieren signifikant verlangsamt. Dieser Parameter war bei den Tieren der präventiven Gruppe signifikant verbessert, jedoch nicht in der Standardgruppe (auf die jeweilige Laufgeschwindigkeit korrigiert, $p < 0.05$, Abb. 20b).

Die Entfernung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schritten (Schrittlänge) war in der Placebogruppe signifikant verkürzt ($p < 0.05$, Abb. 20c), nicht jedoch in der präventiven Behandlungsgruppe. Im Gegensatz zur präventiven Behandlung verbesserte die Standardbehandlung im Vergleich zum Placebo keinen der räumlichen oder kinetischen Gangparameter. Die relative Standphase (*duty cycle*) als Teil des Schrittzklus, ist im rechten Hinterbein der Placebogruppe im Vergleich zu der Präventivgruppe signifikant beeinträchtigt ($p < 0.01$), aber nicht im Vergleich mit der Standardbehandlung (Abb. 20d).

Wie bereits beschrieben, beeinträchtigt der ischämische Schlaganfall die Koordinationsfähigkeit der Tiere. Dies äußerte sich in einem signifikant verringerten Regularitätsindex (im Versuchsdurchlauf zur Etablierung der Ganganalyse). Eine präventive Behandlung mit Antibiotika verbesserte diesen signifikant (Vergleich zu Placebo- und Standardbehandlung, $p < 0.01$, Abb. 20e). Ein weiterer wichtiger Parameter für die Beurteilung der Koordination zwischen den Gliederpaaren ist die Phasendispersion. Sie charakterisiert das Timing der Positionierung zweier Pfoten, welche jeweils als Ziel- oder Ausgangspfote definiert werden. Die Phasendispersion von der linken Vorder- zur rechten Hinterpfote (LV-RH) und von der rechten Vorder- zur linken Hinterpfote (RV-LH) ist in der Gruppe mit dem präventiven Behandlungsansatz, verglichen mit den anderen beiden Gruppen ($p < 0.05$, Abb. 20f), signifikant verbessert. Zusammengefasst verbessert nur die präventive antibiotische Therapie nach Schlaganfall das neurologische Resultat im Vergleich zur Placebobehandlung. Die Standardbehandlung erreichte jedoch keine signifikanten Unterschiede zu der Placebogruppe.

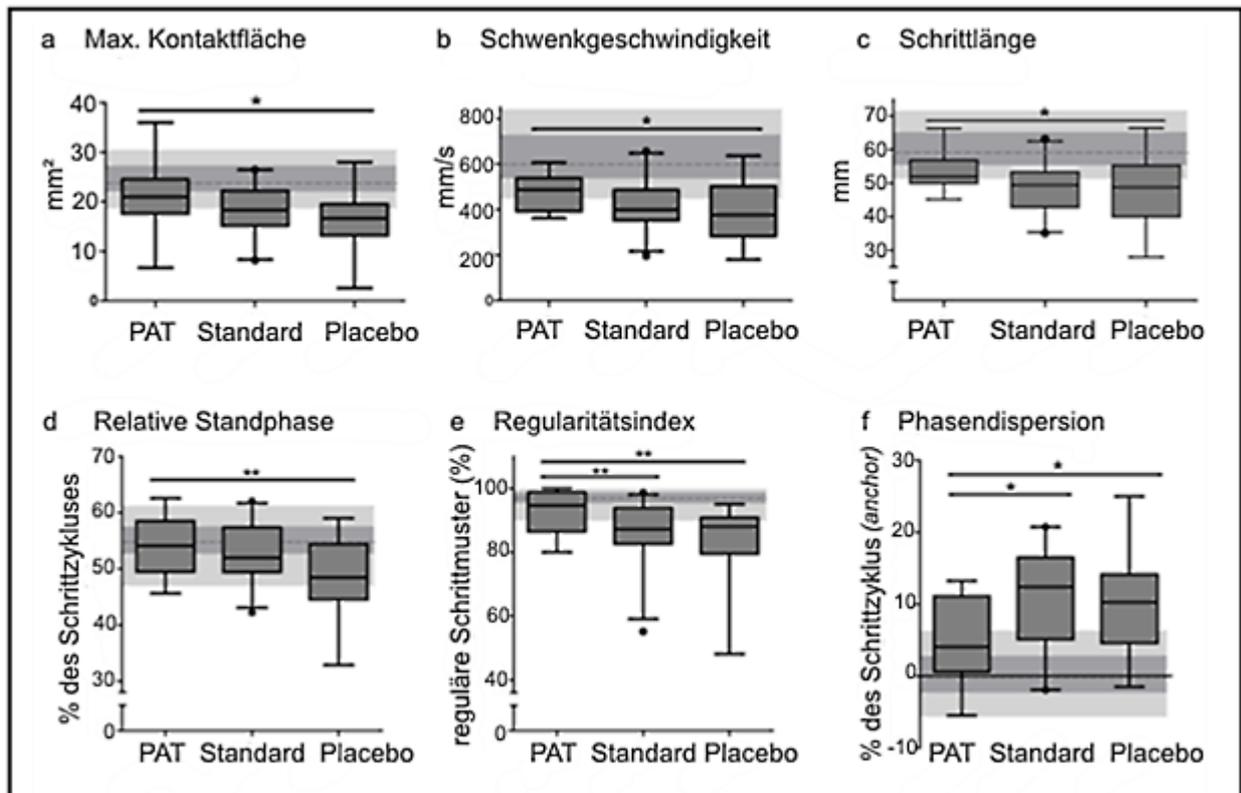


Abb. 20 | (a) Die maximale Kontaktfläche der rechten Hinterpfote, die (b) Schwenkgeschwindigkeit, die (c) Schrittlänge und die (d) relative Standphase waren zwischen der Präventiv- und der Placebogruppe am 10. Tag nach dem Schlaganfall signifikant verringert. Versuchstiere unter der Standardbehandlung zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Placebogruppe. Hinsichtlich des (e) Regularitätsindex zeigten die Tiere aus der Placebo- und Standardgruppe einen weniger koordinierten Lauf, wohingegen die Mäuse aus der präventiven Behandlungsgruppe deutlich regelmäßiger Schrittfolgemuster aufwiesen. Die (f) Phasendispersion zwischen der linken Vorder- zur rechten Hinterpfote (LF-RH) zeigte ebenfalls signifikante Resultate zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Insgesamt war bei den Tieren unter präventiver Antibiotikatherapie eine deutliche funktionelle Besserung nach dem experimentellen Schlaganfall zu sehen. (Box-Whisker-Plots mit Angabe der 5. bis zur 95. Perzentile. Im Hintergrund sind die Werte vor dem Schlaganfall mit Angabe des 1. - 3. Quartils (dunkelgrau) und der 5. - 95. Perzentile (hellgrau) zu sehen. Vergleich der Effektgrößen; $n = 60$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Die gepunktete Linie zeigt den Median).

4.2.6 Immunhistologische Ergebnisse

Nach der Hypothese, dass eine Infektion möglicherweise die inflammatorische Reaktion des ZNS nach einem Schlaganfall verändert, wurde die Lymphozytenzahl der ischämischen Hemisphäre untersucht. Die dominierenden Zellpopulationen unter allen ZNS infiltrierenden Leukozyten (CD45+) waren hier vor allem T-Lymphozyten (CD3+), Makrophagen (CD11b+/Gr1-), Granulozyten (CD11b+/Gr1+) und in einem geringeren Umfang auch B-

Lymphozyten (B220+). Während es eine Tendenz zu niedrigeren Leukozytenzahlen in den antibiotisch behandelten Tieren gab, konnten keine signifikanten Unterschiede des jeweiligen Zelltyps zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet werden (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0.05$; $n = 58$, Tab. 11).

Zelltyp	Präventiv	Standard	Placebo
CD45+	36723 ± 36566	43481 ± 45171	57370 ± 53145
B220+	1744 ± 1381	1767 ± 1036	1739 ± 1221
CD3+	10771 ± 14177	12445 ± 12215	15424 ± 16403
CD3+/CD8a+	4105 ± 6070	4055 ± 3778	4950 ± 4856
CD3+/CD4+	4556 ± 5944	4448 ± 4110	6132 ± 7067
CD11b+/Gr1+	7317 ± 7854	9993 ± 12912	13827 ± 14219
CD11b+/Gr1-	9255 ± 8951	9775 ± 11022	14659 ± 14176

Tabelle 11 | Übersicht über die ermittelte Anzahl unterschiedlicher in das ZNS immigrierter Zellpopulationen, die nach der FACS Analyse in der ischämischen Hemisphäre des Gehirns gemessen worden sind (Mittelwerte ± SD).

Die erheblichen interindividuellen Unterschiede der Zellinfiltration müssen jedoch in der Analyse berücksichtigt werden. Daher wurde untersucht, ob das Ausmaß der Immunzellinfiltration der Wahrscheinlichkeit nach unabhängig vom funktionellen Ergebnis ist. Unter der Verwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ergaben sich für die Anzahl der CD4+/CD8+ T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten eine Korrelation zu den erhobenen Gangparametern. Eine Ausnahme boten hier nur die B220+ Lymphozyten (Tab. 12 und Abb. 21). Das trifft für die Analyse aller Gruppen als auch für die Einzelvergleiche der Placebo- und Standardbehandlung zu. Daher scheint ein schlechteres funktionelles Resultat nach einem Schlaganfall mit einer erhöhten Anzahl infiltrierender Immunzellen positiv zu korrelieren.

Zelltyp	Phasendispersion LF-RH (%)		Duty cycle RH (%)	
	Spearman's ρ	Signifikanz	Spearman's ρ	Signifikanz
CD45+	0.453	0.001	0.406	0.002
B220+	0.209	0.129	0.110	0.411
CD3+	0.471	<0.001	0.398	0.002
CD3+/CD8a+	0.448	0.001	0.433	0.001
CD3+/CD4+	0.476	<0.001	0.374	0.004
CD11b+/Gr1+	0.437	0.001	0.389	0.003
CD11b+/Gr1-	0.472	<0.001	0.422	0.001

Tabelle 12 | Korrelationsmatrix zwischen dem funktionellen Ergebnis und der ZNS infiltrierenden Zellpopulationen. An zwei Parametern wird hier beispielhaft gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen infiltrierenden Lymphozyten und den Gangparametern bestand. Mit Ausnahme der B-Zellen ergaben sich signifikante Werte (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman).

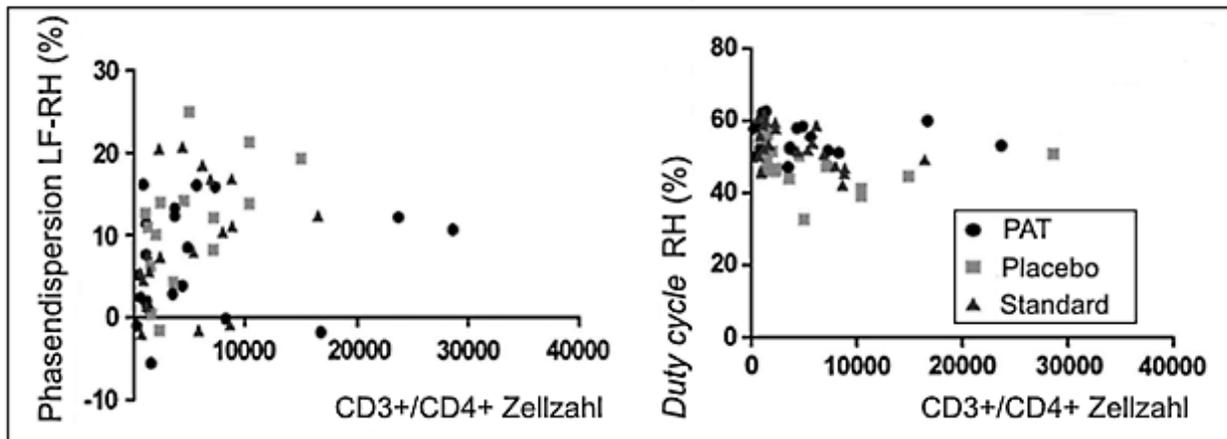


Abbildung 21 | Zwischen den beiden beeinträchtigten Gangparametern der (a) Phasendispersion zwischen linker Vorder- und rechter Hinterpfote und des (b) *duty cycle* der rechten Hinterpfote zeigte sich ein Zusammenhang mit der Anzahl von immigrierten CD3+ und CD4+ T-Zellen.

5 Diskussion

5.1 Etablierung neuer Methoden

5.1.1 Die Ganganalyse als zuverlässiges Messverfahren neurologischer Defizite

Eines der wichtigen Ziele dieser Arbeit war es, ein geeignetes Messverfahren zu etablieren, mit dem ein potentiell günstiger Effekt einer Therapie auf das neurologische Ergebnis gemessen werden kann. Da die Fortbewegung eines Tieres die korrekte Ausführung von verschiedenen Unteraufgaben der komplexen Koordination voraussetzt, schien die Analyse des Laufverhaltens ein vielversprechender Ansatz zu sein. Durch eine zerebrale Ischämie kann das physiologische komplexe Zusammenspiel zwischen den einzelnen Gliedmaßen deutlich beeinträchtigt werden. So wurden in dieser Studie etliche Parameter verschiedener Unteraufgaben des Laufens untersucht und signifikante Unterschiede zwischen der Performance vor und nach dem Schlaganfall festgestellt.

Die Versuchstiere wiesen nach dem Schlaganfall eine verlängerte Standphase (*Stand*) der beiden Vorderpfoten auf. Des Weiteren war der sog. *Duty cycle*, d.h. der Anteil der Gewichtsbelastung im gesamten Schrittzklus, bei den Vorderpfoten leicht erhöht, jedoch bei den Hinterpfoten vermindert. Dies könnte einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, bei dem die Vorderpfoten Aufgaben der beeinträchtigten Hinterpfoten übernehmen. Zudem wurden signifikante Unterschiede der Schwenkgeschwindigkeit (*Swing speed*) und der Schrittlänge (*Stride length*) der Hinterpfoten beobachtet. Die Unteraufgabe des Schwingens scheint

insbesondere bei den Hinterbeinen nach einem Schlaganfall beeinträchtigt zu sein. Eine verminderte Intensität der Fußabdrücke (*Max. intensity*) beider hinteren Pfoten ist möglicherweise ein Indikator für eine verminderte Propulsion der Hinterbeine. Im Vergleich mit den Ergebnissen klinischer Studien von hemiparetischen Patienten zeigten sich sehr ähnliche Defizite der Schwunginitiation und der Antepulsion (Hall et al. 2011). Zusätzlich konnte auch eine Verringerung der maximalen Kontaktfläche (*Max. contact area*) beider Hinterpfoten beobachtet werden, das deutet auf eine weniger effektive Nutzung dieser Pfoten bei Belastung und Fortbewegung hin (Vrinten & Hamers 2003).

Hinsichtlich der Koordination zwischen den einzelnen Pfoten konnten Veränderungen des Regularitätsindex (*Regularity index*) und der Phasendispersion (*Phase dispersion*) des diagonalen Gliederpaares sowie des Beckengürtelpaares beobachtet werden. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass der Übergang vom normalen Laufen ("Gehen") bis zum Trott nur die laterale und diagonale Phasendispersion betrifft, sich jedoch nicht auf die Phasendispersion des Becken- oder Schultergürtels auswirkt (Hamers et al. 2006). In dieser Studie haben die Mäuse den Gehweg des Catwalk™ Systems hauptsächlich trottend zurückgelegt. Das wurde auch aufgrund des kurzen Zeitlimits (0,5 - 5 s) für gültige Durchgänge begünstigt. Typische Zeichen des normalen Laufens konnten bei der Analyse der Phasendispersion ebenfalls nicht bestimmt werden. Bei einem normalen Durchlauf, bei dem sich das Versuchstier trottend fortbewegt hat, betrug die Phasendispersion von diagonalen Paaren (bspw. rechte Vorderpfote - linke Hinterpfote) 75%. Nach der MCAO wurde eine signifikante Veränderung der diagonalen Phasendispersion festgestellt (Tab. 7), die laterale Phasendispersion blieb jedoch unbeeinträchtigt. Stattdessen veränderte sich die Phasendispersion des Beckengürtelpaares. Diese Ergebnisse sprechen folglich nicht für eine veränderte Gangart und Geschwindigkeit des Versuchstieres nach der MCAO. Vielmehr führen diese Ergebnisse zu der Interpretation, dass eine beeinträchtigte Koordinationsfähigkeit durch den Schlaganfall vorliegt, die sich insbesondere auf die hintere Extremität auswirkt.

Der starke Einfluss eines Schlaganfalls auf die Hinterbeine, insbesondere auf die der kontralateralen Pfote, ist neuroanatomisch gut nachvollziehbar. Die Beeinträchtigung der exakten Ausführung einer einzelnen Unteraufgabe kann sich negativ auf die gesamte Koordination des Ganges auswirken. So lassen sich die beobachteten Koordinationsstörungen zwischen einzelnen Gliederpaaren gut erklären. Durch den beeinträchtigten Bewegungsablauf zwischen den Hinterpfoten ist folglich die gesamte Koordinationsfähigkeit nach dem Schlaganfall vermindert. Im Vergleich mit den Ergebnissen einer ähnlicher Untersuchung am Rattenmodell des Schlaganfalls fanden sich Übereinstimmungen hinsichtlich der Koordination

zwischen den Pfoten als auch bei der maximalen Kontaktfläche (Wang et al. 2008). Diese Studie berichtet weiterhin von einer verringerten Intensität des Pfotenabdruckes und einer Beeinträchtigung der sog. Gliederpaarung (sowohl 4 Tage als auch 5 Wochen nach dem Schlaganfall). Die im Mausmodell beobachteten Veränderungen der Schrittlänge und der Standphase, wie es auch bei Schlaganfallpatienten üblich ist, konnten in dieser Studie an Ratten nicht festgestellt werden. Interessanterweise konnten diese Defizite durch eine übermäßige Anreicherung von Laufrädern und ähnlicher Ausstattungen für den Käfig verbessert werden (Wang et al. 2008).

In einem fothrombotischen Schlaganfallmodell der Ratte verringerte die Ischämie die Intensität und die Größe der Kontaktfläche der kontralateralen Hinterpfote (Vandeputte et al. 2010). Die Veränderungen wurden allerdings nur zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach einem experimentellen Schlaganfall (24 - 48 h) festgestellt. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen war die Schwenkgeschwindigkeit der kontralateralen Hinterpfote auch über einen längeren Zeitraum vermindert (12 Wochen). Die maximale Intensität des Pfotenabdruckes und der *Duty cycle* wiesen bis zu 2 Wochen nach der Ischämie einen verringerten Wert auf. Die Koordination zwischen den einzelnen Pfoten war ebenso lang beeinträchtigt (Encarnacion et al. 2011). In der bisher einzigen veröffentlichten Untersuchung an Mäusen (Lubjuhn et al. 2009) wurden verschiedene funktionelle Tests, unter ihnen drei unterschiedliche Systeme zur Ganganalyse nach permanenter distaler MCAO, untersucht. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden mit automatischen Systemen (mit oder ohne Laufband) Unterschiede in der *Stance-* und *Brake duration* beobachtet (2 Tage nach der MCAO). Signifikante Unterschiede der Schrittlänge wurden hingegen nicht festgestellt.

Diese Differenzen können durch die unterschiedlichen Schlaganfallmodelle bedingt sein. Die im Kapitel 2.4 beschriebene MCAO führt zu einer Beeinträchtigung der Funktionen sowohl des Kortex als auch des Striatums. Im Gegensatz dazu resultiert eine permanente distale MCAO in einer kortikalen Läsion. Des Weiteren wurde in den genannten Studien nicht dezidiert über die Koordination zwischen den einzelnen Pfoten oder anderen zeitlichen und kinetischen Parametern berichtet, die Defizite einzelner Unteraufgaben der Gangkoordination offenlegen können.

Eine wichtige Limitation der Studie zur Ganganalyse ist die Abhängigkeit von der Laufgeschwindigkeit, da viele Parameter durch diese beeinflusst werden. Deshalb wurden die entsprechenden Parameter mathematisch korrigiert oder es sind geschwindigkeitsunabhängige Parameter verwendet worden. Aufgrund des Studiendesigns konnten die funktionellen Defizite ferner nicht mit dem Infarkt volumen verglichen werden. Ein zusätzliches zerebrales MRT war aufgrund der bereits belastenden Prozedur der Lungenbildgebung und einer damit verbundenen

Forcierung der ohnehin hohen Sterblichkeitsrate der Versuchstiere nicht möglich. Obwohl das Infarkt volumen nicht unbedingt mit der funktionellen Schädigung korreliert (Encarnacion et al. 2011; Lloyd-Jones et al. 2009), stellt es dennoch eine Limitation dar.

Die Ergebnisse dieser Studie sind ferner nur für dieses Modell und diesen gewählten Zeitpunkt gültig. Entsprechend der Resultate anderer Forschungsgruppen (Encarnacion et al. 2011) kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede der Performances vor und nach Schlaganfall zu einem früheren Zeitpunkt (< 10 Tage nach MCAO) deutlicher ausgefallen wären. In der klinischen Schlaganfallforschung ist ein Zeitraum von 3 Monaten nach dem Schlaganfall für die Evaluierung von Langzeitergebnissen anerkannt. Für die experimentelle Forschung am Mausmodell bestehen allerdings noch keine fest definierten Zeitpunkte für die Untersuchung von Kurz-, Mittel- und Langzeitresultaten. In Anbetracht der Tatsache, dass die akute Phase des Schlaganfalls bei Mäusen innerhalb der ersten Woche abgeschlossen ist (Dirnagl et al. 2003) und der generell kurzen Genesungszeit von Mäusen, im Vergleich zum Menschen, wurde ein Zeitpunkt von 10 Tagen nach der MCAO als realistisches Maß für die Evaluation von Mittel- bis Langzeitergebnissen angenommen. Weiterführende Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen sind notwendig, um die Eignung der Ganganalyse für die Untersuchung von neurologischen Langzeitergebnissen zu testen. Es ist jedoch nur eine weitere mögliche Option für die Untersuchung des komplexen neurologischen Ergebnisses nach einem experimentellen Schlaganfall, denn nur wenige der erhobenen Parameter zeigten nach der MCAO Veränderungen, die gemäß der Analyse der Anwendbarkeit (Kapitel 3.1.1.2) groß genug waren, um das Signifikanzniveau zu erreichen. Nach der dargestellten Berechnung ist für den Nachweis eines neuroprotektiven bzw. regenerativen Effektes eine Gruppengröße von 15 - 20 Tieren notwendig. Die erforderliche Gruppengröße kann jedoch aufgrund der hohen Komplikationsrate während des Experiments (Meisel & Meisel 2011) oftmals nicht bis zum Versuchsende aufrechterhalten werden. Insbesondere zwischen dem 3. und 6. Tag nach der MCAO bestand eine sehr hohe Pneumonierate und ein damit verbundenes forciertes Sterblichkeitsrisiko (Engel & Meisel 2010). Des Weiteren beeinflusste ein schlechter Gesundheitszustand oftmals die jeweilige Motivation bzw. Fähigkeit des Versuchstieres, den Lauf absolvieren zu können, negativ.

Zusammengefasst ist die Ganganalyse eine vielversprechende verlässliche Methode, um neurologische Defizite bezüglich des Laufverhaltens und der Koordination aufzudecken. Sie stellt jedoch nur einen Bestandteil von vielen Tests dar, um komplexe neurologische Geschehnisse nach einem experimentellen Schlaganfall evaluieren zu können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich viele schlaganfallsensitive Gangparameter sowohl beim Menschen

als auch bei Mäusen auf sehr ähnliche Weise verändern. Aus diesem Grund scheint die Ganganalyse ein guter Indikator für die Wirksamkeit therapeutischer Behandlungsansätze, insbesondere bei der schwierigen Translation von "*bench to bedside*" Studien, zu sein. Es wird dennoch weiterhin eine anspruchsvolle Aufgabe bleiben, funktionelle Defizite nach experimentellem Schlaganfall im Tiermodell sensitiv und mit einer guten Aussagekraft zu untersuchen.

5.1.2 MRT als geeignete Methode zur Diagnose einer Pneumonie

Für diese Studie war es notwendig, eine Pneumonie an lebenden Mäusen diagnostizieren zu können. Hierfür wurde eine neue Methode mittels MRT entwickelt. Der bisherige Goldstandard zur Untersuchung einer möglichen Pneumonie bestand darin, nach der Tötung des Tieres die Lunge zu entnehmen und anschließend einer Keimspektrumanalyse und Keimzahlquantifizierung zu unterziehen. Hierin begründete sich die Notwendigkeit eines Verfahrens zur *In-vivo*-Diagnostik. Des Weiteren neigen Mäuse aufgrund ihrer ökologischen Nische als potenzielles Beutetier dazu, ihr Krankheitsverhalten zu verstecken (Tizard 2008). Es scheint daher folgerichtig, dass ein weniger dramatischer Verlauf einer Lungenentzündung oder Infektion im Allgemeinen durch alleinige Anwendung eines klinischen Parameters übersehen werden kann. Hier zeigte sich die magnetresonanztomografische Bildgebung als geeignetes Verfahren, um auch leichte bis mittelschwere Pneumonien diagnostizieren zu können, die mit einer alleinigen Evaluation des Gesundheitszustandes des Tieres leicht hätten übersehen werden können. Die statistische Analyse der Gegenüberstellung von Goldstandard und MRT zeigte ein Konfidenzintervall von 95%.

Ein entscheidender Nachteil des Verfahrens ist die Anfälligkeit für Bewegungsartefakte durch die Herzkreislauf- und Atemtätigkeit des Versuchstieres. Um diese zu minimieren, sind MRT-fähige Gating-Systeme notwendig. Bei der Durchführung dieser Diagnostik muss ferner bedacht werden, dass eine vollständige Aufnahme des Thorax ca. 30 - 45 min pro Tier in Anspruch nimmt. Bei einem großen Stichprobenumfang, wie auch in dieser Studie, sollte das Studiendesign entsprechend angepasst werden, sodass das MRT auf 2 oder mehrere Tage aufgeteilt werden kann. Die Prozedur steigert das Stresslevel für das Versuchstier erheblich und begünstigt eine erhöhte Sterblichkeit.

Die Auswertung erfolgt durch manuelle Markierung jeder einzelnen Schichtung der Lunge. Dies gestaltet sich bei entsprechender Gruppengröße als langwierig, ist jedoch einem automatisierten Verfahren hinsichtlich der Genauigkeit überlegen. Bei den Versuchstieren mit einer

nachgewiesenen Infektion der Lunge (> 100.000 CFU) zeigte sich auch in der MRT ein Anteil von 6 - 7% hyperintenser Areale des gesamten Lungenparenchyms. Ein Wert von unter 3,5% entsprach dem normalen Signal-Rausch-Verhältnis einer gesunden Lunge und spricht gegen das Vorliegen einer Pneumonie. Das bildgebende Verfahren bot neben dem allgemeinen Gesundheitsscore der Maus einen sicheren Parameter zur Einschätzung des Gesundheitszustandes und insbesondere einer Pneumonie. Des Weiteren konnte sowohl das bildgebende Verfahren zur Diagnose einer Lungenentzündung als auch die Ganganalyse zur Untersuchung des neurologischen Ergebnisses etabliert werden, beide stellten sich als zuverlässige Methoden dar.

5.2 Die präventive Antibiotikatherapie im Vergleich zur Standardtherapie des ischämischen Schlaganfalls

Vergleicht man die in dieser Studie angewandte präventive Antibiotikatherapie mit der aktuell geltenden Standardtherapie des akuten ischämischen Schlaganfalls, konnte die PAT zum einen das Auftreten einer Pneumonie erfolgreich verhindern und zum anderen das allgemeine medizinische Ergebnis verbessern. Eine PAT konnte die Fraktion hyperintenser Areale der Lunge als Anzeichen einer Pneumonie von 6,8% in der Placebogruppe bzw. 6,3% in der Standardgruppe signifikant auf 3,7% reduzieren. Das Auftreten einer Infektion war nicht nur mit einem schlechteren allgemeinen Gesundheitszustand assoziiert, sondern äußerte sich zudem in einer deutlich erhöhten Sterblichkeitsrate. So konnte die Überlebensrate sowohl unter der PAT (81%) als auch unter Standardtherapie (88%) signifikant gegenüber der Rate von nur 55% der Placebogruppe gesteigert werden. Die Sterblichkeitsrate konnte folglich unter antibiotischer Therapie signifikant verringert werden. In einer ähnlichen experimentellen Schlaganfallstudie konnte gezeigt werden, dass schlaganfallassoziierte Infektionen mit einer entweder sofortigen oder 12 Stunden nach dem Schlaganfalleintritt begonnenen antibakteriellen Therapie mit Moxifloxacin wirksam verhindert werden können (Meisel et al. 2004). Das Resultat verbesserte sich nach experimentellem Schlaganfall maßgeblich durch die präventive Verabreichung eines Antibiotikums und äußerte sich in einer Reduktion der Mortalität um 40%. Außerdem war der Anteil der Tiere mit keinen oder nur leichten Defiziten in der Antibiotikagruppe im Vergleich zur Placebogruppe nahezu verdoppelt (Meisel et al. 2004). Eine Limitation der genannten Studie ist die fehlende Gegenüberstellung eines präventiven Behandlungsansatzes mit der aktuellen Standardtherapie. In der vorliegenden Arbeit sollte die klinische Situation im Tierexperiment

simuliert werden ("*bed to bench approach*"), um mögliche Schwachstellen der Studie aufgrund des Designs zu minimieren. Oftmals ist das ein wichtiger Grund für die Limitation einer Schlaganfallstudie und eine daraus resultierende schwierige Übersetzbarkeit von Erkenntnissen der Grundlagenforschung in die klinische Behandlung (Mergenthaler & Meisel 2012). Zudem wird dadurch eine qualitative Verbesserung der experimentell gewonnenen Erkenntnisse für eine zuverlässigere Translation in den klinischen Alltag angestrebt. Es wurde daher neben dem Vergleich des präventiven Behandlungskonzepts mit einem Placebo auch die Standardtherapie im experimentellen Umfeld untersucht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten zu keinem Zeitpunkt ein Antibiotikum, sondern nur die Trägerlösung des Verums (Natriumchlorid).

In der klinischen Situation entwickeln ca. 30% aller Schlaganfallpatienten eine Infektion. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Pneumonien und Harnwegsinfektionen. Die Infektionsrate von schwer betroffenen Patienten, die eine Intensivbetreuung benötigen, ist mit 45% sogar noch höher (Westendorp et al. 2011). In dem hier verwendeten Schlaganfallmodell, das einen schweren Mediainfarkt hervorruft, wiesen die Mäuse ohne antibiotische Behandlung einen schlechteren Allgemeinzustand auf und hatten häufiger eine Lungeninfektion. In einer Metaanalyse zeigte sich, dass eine antibakterielle Prophylaxe beim Patienten das Auftreten von schlaganfallassoziierten Infektionen deutlich verringern kann, allerdings fehlen bisher klare Aussagen bezüglich des Einflusses auf die Letalität und das funktionelle Ergebnis (van de Beek et al. 2009). Übereinstimmend mit diesen klinischen Resultaten zeigte sich in dieser Studie, dass präventiv behandelte Mäuse ebenfalls suffizient vor Infektionen geschützt sind.

Des Weiteren hatten in dieser Studie Tiere mit Infektionsanzeichen eine deutlich geringere Überlebenschance, korrespondierend mit klinischen Ergebnissen, bei denen die Mortalität von Patienten mit einer Infektion ungefähr dreimal so hoch ist wie bei denen ohne Infektion (Katzan et al. 2003). Insbesondere die Pneumonie ist eine der Hauptursachen für die hohe Sterblichkeit nach einem Schlaganfall (Heuschmann et al. 2004; Westendorp et al. 2011).

Sowohl klinische Beobachtungen als auch Tierexperimente zeigen, dass ein Gewichtsverlust nach einem Schlaganfall ein häufiges Phänomen ist. Verschiedene Signaltransduktionswege tragen durch ein entstehendes metabolisches Ungleichgewicht zu diesem Phänomen bei (Scherbakov et al. 2011). Bei den Tieren dieses Experiments trat ebenfalls, unabhängig von der Behandlungsgruppe, ein wesentlicher Gewichtsverlust auf. Die präventiv behandelten Tiere erlangten jedoch ihr Ausgangsgewicht im Vergleich zu den anderen Gruppen schneller wieder. Bei Patienten korreliert der Gewichtsverlust mit einem schlechteren funktionellen Ergebnis (Jönsson et al. 2008). Möglicherweise trug die schnellere Wiedererlangung des Ausgangsgewichtes zu dem besseren funktionellen Ergebnis der präventiv behandelten Kohorte

bei. Schlaganfallassoziierte Infektionen korrelieren beim Menschen mit einem schlechteren neurologischen Resultat (Johnston et al. 1998; Westendorp et al. 2011). In dieser experimentellen Studie konnten ähnliche Effekte bezüglich des funktionellen Ergebnisses beobachtet werden. Verschiedene räumliche und kinetische Gangparameter waren in der präventiven Antibiotikagruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant verbessert. In der bereits erwähnten experimentellen Studie wurde ebenfalls über ein verbessertes funktionelles Ergebnis berichtet. Dieses wurde mit dem Bederson Score eingeschätzt und lag nur für einen kurzen Beobachtungszeitraum vor (Meisel et al. 2004). Zusammengefasst stimmen die Resultate dieser Studie mit den Ergebnissen klinischer Studien überein, bei denen Patienten ohne Infektionen bessere Ergebnisse nach dem Schlaganfall aufwiesen als jene mit Infektionen (Harms et al. 2008; Rocco et al. 2012). Im Gegensatz zu den bereits genannten Ergebnissen konnte eine aktuelle randomisierte klinische Studie mit 2550 Patienten, bei denen Ceftriaxon präventiv eingesetzt wurde, keine Verbesserung des neurologischen Ergebnisses (3 Monate nach Schlaganfall, *modified Rankin Scale*) nach dem Schlaganfall feststellen (PASS Studie, Westendorp et al. 2015). In Zusammenschau der Studienergebnisse stellt sich die Frage, ob schlaganfallassoziierte Infektionen ein neurologisch schlechtes Ergebnis ursächlich beeinflussen oder ob es vielmehr nur ein hinweisender Marker für ein schlechteres Resultat ist. Die PASS Studie suggeriert, dass Infektionen nur als Indikator für ein ungünstigeres Ergebnis nach Schlaganfall fungieren. Das sollte kritisch hinterfragt werden (Meisel 2015). Die Reduktion der Infektionsrate konnte in der klinischen Studie hauptsächlich durch eine Minimierung von Harnwegsinfektionen erreicht werden, nicht aber durch die Vermeidung von Pneumonien. Ohne einen prognostisch günstigen Effekt ist der Einsatz einer präventiven Antibiose jedoch nicht zu rechtfertigen.

Eine wichtige Beobachtung dieser Studie ist, dass, zunächst unabhängig von einer antibiotischen Behandlung, das alleinige Auftreten einer Infektion entscheidend für das neurologische Ergebnis ist. Die Prävention einer Infektion scheint somit einer der wichtigsten Ansatzpunkte der Behandlung nach einem Schlaganfall zu sein. Es ist spekulativ, ob das verbesserte neurologische Resultat möglicherweise durch einen direkten neuroprotektiven Effekt des antibiotischen Medikamentes zustande kommt. Es wurden beispielsweise neuroprotektive Effekte für die Antibiotika Ceftriaxon (Thöne-Reineke et al. 2008) und Minocyclin (Lampl et al. 2007) nachgewiesen, ungeachtet dessen, dass die Effektivität des Letzteren nicht in einer präklinischen Studie bewiesen werden konnte (O'Collins et al. 2011). In einer adoptiven Zelltransfer-Studie zur Wiederherstellung der Immunfunktion wies die Behandlung mit einem Gyraseinhibitor keine neuroprotektive Wirkung auf (Meisel et al. 2004). Aus diesem Grund scheint die

Neuroprotektion des Antibiotikums durch die Prävention bzw. Milderung der infektionsbedingten systemisch inflammatorischen Immunantwort indirekt zu wirken.

Da ein Schlaganfall eine lokale Entzündungsreaktion der betroffenen Hemisphäre induziert (Chamorro & Hallenbeck 2006; Dirnagl et al. 2007) und eine Infektion das systemische inflammatorische Profil des Gehirnes verändert, kann vermutet werden, dass der Unterschied des funktionellen Ergebnisses möglicherweise mit der Änderung des inflammatorischen Profils des ZNS assoziiert ist. Dementsprechend wurde die Leukozytenanzahl der betroffenen Hemisphäre analysiert. Es ergab sich eine signifikante Relation zwischen der Anzahl an T - Lymphozyten/myeloiden Zellen und dem neurologischen Ergebnis. Es existierte jedoch kein Zusammenhang zwischen ZNS infiltrierenden Immunzellen und der im MRT gemessenen Lungeninfektion. In dieser Analyse war die Stichprobengröße allerdings kleiner. Aufgrund der hohen Mortalität in der Placebogruppe stammen die Daten hauptsächlich von Antibiotika behandelten Tieren. In der Verteilung fehlten folglich vor allem Tiere mit schweren Infektionen. Die Daten suggerieren dennoch, dass ein schlechteres funktionelles Ergebnis mit einer erhöhten Infiltration peripherer Immunzellen in das Gehirn assoziiert ist. Diese Beobachtung ist jedoch limitiert: Es wurde nur eine auf einen späten Zeitpunkt (Tag 13 nach der MCAO) begrenzte quantitative Analyse der ZNS infiltrierenden Immunzellen vorgenommen. Während es einen Trend zu einer niedrigeren Anzahl infiltrierender Immunzellen bei antibiotisch behandelten Tieren gab, kann die bloße Reduktion der Zellinfiltration das verbesserte funktionelle Ergebnis nicht allein erklären. Obwohl eine frühe T-Zellinfiltration durch eine Prävention von schlaganfallassoziierten Infektionen mittels Antibiotika zwar vermindert werden würde, muss die T-Zellinfiltration nicht unbedingt die Ursache für ein schlechteres funktionelles Ergebnis sein. Es kann auch ein Surrogatparameter für eine Entzündung darstellen. Eine detaillierte Charakterisierung der systemischen und lokalen Immunantwort, insbesondere eine Beurteilung des inflammatorischen Profils der ischämischen Hemisphäre und des funktionellen Phänotyps der infiltrierenden Immunzellen und die Gegenüberstellung mit dem neurologischen Ergebnis, können zu weiteren Anhaltspunkten führen, warum eine in der Peripherie beginnende Infektion Einflüsse auf das ZNS und somit auf das funktionelle Endresultat hat. Eine solche Untersuchung bezüglich der komplexen immunologischen Mechanismen war jedoch kein Kernpunkt dieser Studie.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser experimentellen Studie für einen Einsatz einer präventiven Antibiotikatherapie. Auch andere experimentelle und klinische Studien zeigten vielversprechende Resultate durch den Einsatz einer präventiven Antibiose. Dennoch bleibt die Frage offen, ob sich die PAT auch im klinischen Alltag mit ähnlich positiven Effekten beweisen kann. So konnte in einer aktuellen klinischen Studie kein Vorteil einer präventiven Antibiose

hinsichtlich der Letalitätsreduktion oder der Verbesserung des neurologischen Ergebnisses nachgewiesen werden (Westendorp et al. 2015). Die Anwendung des verwendeten Antibiotikums (Ceftriaxon) für die präventive Therapie gestaltete sich jedoch als sicher. Der prinzipielle Einsatz eines Breitspektrum-Antibiotikums bei allen Schlaganfallpatienten muss zuletzt nicht nur aufgrund der steigenden Resistenzentwicklung von Krankenhauskeimen kritisch beleuchtet werden.

5.3 Ausblick

In der klinischen Behandlung von Schlaganfallpatienten wird eine Standardbehandlung nach diagnostizierter Infektion eingeleitet. Im Falle einer Pneumonie umfasst das beispielsweise die Applikation eines β -Lactam-Antibiotikums, wie Acylaminopenicilline und Cephalosporine oder Flourchinolone. Die aktuellen Behandlungsrichtlinien für Schlaganfallpatienten beinhalten keine Empfehlung zur präventiven Verwendung von Antibiotika (Harms et al. 2010). Hinsichtlich der Sterblichkeitsreduktion wurde in dieser Studie gezeigt, dass sowohl die Standardtherapie als auch die präventive Therapie die gleiche Effektivität besitzen. Die Ergebnisse der Ganganalyse berücksichtigend, ist der präventive Behandlungsansatz jedoch gegenüber der Standardbehandlung überlegen. Der Beginn der antibiotischen Behandlung scheint wichtig zu sein, um die negativen Effekte einer Infektion auf die neurologischen Resultate zu verhindern. Eine rechtzeitige Diagnose auftretender Infektionen gestaltet sich jedoch oft schwierig. Die Kriterien zur Diagnostik umfassen laut den Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (*Centers for Disease Control*, Atlanta, Georgia, USA) pathologische Ergebnisse der Labor- und klinischen Untersuchungen sowie entsprechende Anzeichen im Röntgenbild der Lunge. Insbesondere radiologische Anzeichen sind jedoch erst in einem späten Stadium der Pneumonie zu sehen.

Die experimentellen Ergebnisse sprechen für die Notwendigkeit weiterer klinischer Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen schlaganfallassoziierter Infektionen hinsichtlich des funktionellen Ergebnisses. Aktuelle große Studien untersuchen die Fragestellung, ob eine präventive antibiotische Behandlung das Resultat verbessern kann (Nederkoorn et al. 2011; STROKE-INF Study, Kalra 2014). Obwohl es bisher noch nicht in einer Phase IIb Studie bestätigt worden ist (Harms et al. 2008), kann die präventive Anwendung eines Antibiotikums negative Auswirkungen durch zunehmende Resistenzentwicklungen haben. Daher ist die frühzeitige Identifikation von infektionsgefährdeten Patienten von essenzieller Bedeutung, um

die präventive Behandlung gezielt bei diesen Patienten anzuwenden, ohne die Zunahme der Antibiotikaresistenzen zu fördern. Im Blut zirkulierende Biomarker, wie beispielsweise Procalcitonin, könnten für die Identifikation von Risikopatienten hilfreich sein. Die STRAWINSKI-Studie (Ulm et al. 2012) untersuchte, ob eine solche Biomarker gesteuerte antibiotische Behandlung das neurologische Ergebnis nach einem schweren Schlaganfall verbessern kann. Die Methode basiert auf einer schnellen Identifikation von Infektionen durch eine ultrasensitive Procalcitonin-Messung. Fasst man den aktuellen Wissensstand zusammen, scheinen Patienten von einer Prävention schlaganfallassoziierter Infektionen deutlich profitieren zu können. Der nächste Schritt ist die Überprüfung, ob und unter welchen Bedingungen eine präventive Antibiotikatherapie (PAT) wirksam beim Menschen eingesetzt werden kann. Da schlaganfallassozierte Infektionen auch häufig in experimentellen Schlaganfallstudien auftreten können, sollte eine prophylaktische antibiotische Behandlung auch für präklinische Studien in Betracht gezogen werden, bei denen die Nebeneffekte einer Infektion bestimmte Mechanismen oder die gesamte Studie negativ beeinflussen. Die PASS Studie eröffnet wichtige Fragestellungen, die weitere Studien zu diesem Thema rechtfertigen. Es muss untersucht werden, ob Breitspektrum-Antibiotika als Monotherapie für schlaganfallassozierte Pneumonien wirklich geeignet sind und warum in der genannten Studie eine Lungenentzündung unter bestehender präventiver Ceftriaxon-Therapie nicht verhindert werden konnte (Meisel 2015).

Die Resultate der Post-hoc Analyse suggerierten, dass in einer Subgruppe von Schlaganfallpatienten mit einer intravenösen Thrombolyse, der Einsatz einer präventiven Antibiotika-Therapie das neurologische Ergebnis verbessern konnte (Westendorp et al. 2015). Dies lässt Spekulationen über mögliche zugrunde liegende Mechanismen zu. Eine aktuell noch nicht veröffentlichte Studie über den Einsatz von präventiver Antibiose nach einem Schlaganfall (STROKE-INF Study, Kalra 2014) könnte weitere Aufschlüsse über die Fragestellungen geben.

6 Zusammenfassung

Schlaganfallpatienten haben im Vergleich zu anderen internistischen oder neurologischen Erkrankungen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität für Infektionen. Eine wichtige Ursache hierfür ist neben einer Dysphagie und der damit verbundenen erhöhten Aspirationsgefahr, auch das sogenannte schlaganfallinduzierte Immundepressionssyndrom (SIIDS). Insbesondere die bakteriellen schlaganfallassoziierten Pneumonien beeinflussen die Sterblichkeitsrate und das funktionelle Ergebnis maßgeblich. Die Lungenentzündung stellt somit den häufigsten, therapeutisch modifizierbaren Faktor für eine schlechtere Prognose nach einem Schlaganfall dar. Das Hauptziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob eine präventive Antibiotikatherapie (PAT) der aktuellen Standardtherapie nach Leitlinie des akuten ischämischen Schlaganfalls, die eine antibiotische Behandlung erst nach der Diagnose einer Infektion empfiehlt, überlegen ist und sowohl die Infektions- und Letalitätsrate reduzieren als auch das funktionelle Defizit verbessern kann. Hierfür wurden nach dem Prinzip *"from bed to benchside"* ein entsprechendes Studiendesign und neue Methoden entwickelt, die eine Diagnostik und anschließende Behandlung von Infektionen, gemäß der klinischen Behandlung von Schlaganfallpatienten, im experimentellen Rahmen an der lebenden Maus ermöglicht. Durch operativen Verschluss der A. cerebri media (MCAO) mit einem temporär einliegenden Filament wurde zunächst ein ischämischer Schlaganfall an der Maus herbeigeführt. Die Untersuchung der Lunge erfolgte mit einem dafür neu etablierten MRT-Untersuchungsprotokoll, das sich im Vergleich zum bisherigen Goldstandard (bakterielle Quantifizierung entnommener Lungen) als zuverlässig erwies. Nach zuvor definierten Kriterien wurde bei den Versuchstieren der Standardbehandlungsgruppe mit positiven MRT-Befunden eine antibiotische Therapie mit Enrofloxacin, im Sinne der Standardtherapie einer Pneumonie am Menschen, eingeleitet. Im Gegensatz dazu erhielten die Tiere aus der PAT-Gruppe das Medikament direkt nach der MCAO. Zusätzlich wurde auch eine Kontrollgruppe im Sinne einer „Placebobehandlung“ untersucht. Die Scheinbehandlung der Tiere wurde mit der Trägerlösung (Natriumchlorid) für das Verummedikament durchgeführt. Für die Überwachung der physischen Verfassung der Tiere wurde der allgemeine Gesundheitsscore der Maus (MGHS, *mice general health score*) entwickelt, der typische Indikatoren des Wohlbefindens bzw. der Krankheit beinhaltet. Der MGHS war zum einen für die Entscheidung wichtig, wann ein Versuchstier der Standardgruppe die antibiotische Behandlung erhalten sollte, und zum anderen erlaubte die Auswertung des MGHS-Scores Rückschlüsse auf einen Einfluss der PAT hinsichtlich des Gesundheitszustands. Für die Untersuchung und Beurteilung neurologischer Defizite wurde eine automatische computerassistierte Methode der Ganganalyse

etabliert, mit deren Hilfe schlaganfallsensitive Gangparameter ausfindig gemacht werden konnten. Diese Studie wurde in Analogie zu einer klinischen Studie mit Verblindung des Untersuchers durchgeführt.

Die PAT reduzierte im Gegensatz zu der Standardbehandlung und der Placebobehandlung das Auftreten von Pneumonien signifikant. Ebenso verhielt es sich bei dem neurologischen Untersuchungsbefund. Nur die PAT konnte funktionelle Defizite im Vergleich zur Standard- und Placebogruppe signifikant reduzieren. Des Weiteren wiesen die mit der PAT behandelten Tiere, insbesondere an den letzten Tagen des Versuchsdurchlaufes einen signifikant verbesserten Gesundheitsscore auf. Die präventive Behandlung beeinflusst damit die Prognose nach dem experimentellen Schlaganfall positiv. Hinsichtlich der Letalitätsrate zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Standardgruppe (88%) und der PAT (81%). Jedoch reduzierten beide Behandlungsstrategien die Sterblichkeit gegenüber dem Placebo (55%) signifikant. Im experimentellen Schlaganfallmodell der Maus ist die PAT der Standardtherapie hinsichtlich des funktionellen Ergebnisses überlegen. Unter Berücksichtigung einer aktuell negativen klinischen Studie sollte das Therapieprinzip im Rahmen weiterer klinischer Studien geprüft werden.

Literaturverzeichnis

- Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 1996;27(10):1739–43.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17(3):472–6.
- Bland JM, Altman DG. One and two sided tests of significance. *BMJ* 1994;309(6949):248.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307–10.
- Bland M. How do I compare methods of measurement which give results in different units? In: *Frequently asked questions on the design and analysis of measurement studies*. University of York; 2004.
- Carlini EA, Teresa M, Silva A, Cesare LC, Endo RM. Effects of chronic administration of beta-(3,4-dimethoxyphenyl)-ethylamine and beta-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-ethylamine on the climbing rope performance of rats. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med* 1967;17(6):534–42.
- Carstens E, Moberg GP. Recognizing Pain and Distress in Laboratory Animals. *ILAR J* 2000; 41(2):62-71.
- Chamorro A, Hallenbeck J. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke* 2006;37(2):291–3.
- Chamorro a, Horcajada JP, Obach V, Vargas M, Revilla M, Torres F, et al. The Early Systemic Prophylaxis of Infection After Stroke study: a randomized clinical trial. *Stroke* 2005;36(7):1495–500.
- Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 2012;8(7):401–10.
- Dávalos a, Toni D, Iweins F, Lesaffre E, Bastianello S, Castillo J. Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European cooperative acute stroke study (ECASS) I. *Stroke* 1999;30(12):2631–6.
- Davenport RJ, Dennis MS, Wellwood I, Warlow CP. Complications after acute stroke. *Stroke* 1996;27(3):415–20.
- De Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77(3):634–43.

- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. überarbeitete Version, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2008; S. 654ff.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). Sekundärprophylaxe des ischämischen Insults. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012;1–27.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Empfehlungen zur Organisation der Behandlung. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2014;1–17.
- Di Carlo A. Human and economic burden of stroke. *Age Ageing* 2009;38(1):4–5.
- Diener H-C, Ringelstein EB, von Kummer R, Landgraf H, Koppenhagen K, Harenberg J, et al. Prophylaxis of thrombotic and embolic events in acute ischemic stroke with the low-molecular-weight heparin certoparin: results of the PROTECT Trial. *Stroke* 2006;37(1):139–44.
- Dirnagl U, and the members of the MCAO-SOP Group. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Nat Preced* 2009;1–14.
- Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009;8(4):398–412.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999(9):391–7.
- Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* 2007;38(2 Suppl):770–3.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26(5):248–54.
- Emsley HCA, Hopkins SJ. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol* 2008;7(4):341–53.
- Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinberg GK, Shamloo M. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods* 2011;196(2):247–57.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp* 2011;2–5.
- Engel O, Meisel A. Models of infection before and after stroke: investigating new targets. *Infect Disord Drug Targets* 2010;10(2):98–104.
- Faul F, Erdfelder E, Buchner A. G*power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175–91.

- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler D a., et al. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 2009;40(5):1849–57.
- Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1998;801(1-2):1–8.
- Gupta R, Connolly ES, Mayer S, Elkind MS V. Hemispherectomy for massive middle cerebral artery territory infarction: a systematic review. *Stroke* 2004;35(2):539–43.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008;359(13):1317–29.
- Hall AL, Peterson CL, Kautz SA, Neptune RR. Relationships between muscle contributions to walking subtasks and functional walking status in persons with post-stroke hemiparesis. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2011;26(5):509–15.
- Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, Veldhuis WB, Gispen WH. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J Neurotrauma* 2001;18(2):187–201.
- Hamers FPT, Koopmans GC, Joosten E a J. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23(3-4):537–48.
- Hamidon BB, Raymond AA, Norlinah MI, Jefferelli SB. The predictors of early infection after an acute ischaemic stroke. *Singapore Med J* 2003;44(7):344–6.
- Hampton TG, Stasko MR, Kale A, Amende I, Costa ACS. Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav* 2004;82(2-3):381–9.
- Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ. E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996;27(8):1386–91; 1391–2.
- Harms H, Prass K, Meisel C, Klehmet J, Rogge W, Drenckhahn C, et al. Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2008;3(5):2158.
- Hetze S, Engel O, Römer C, Mueller S, Dirnagl U, Meisel C, et al. Superiority of preventive antibiotic treatment compared with standard treatment of poststroke pneumonia in experimental stroke: a bed to bench approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(6):846–54.
- Hetze S, Römer C, Teufelhart C, Meisel A, Engel O. Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. *J Neurosci Methods* 2012;206(1):7–14.
- Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Janzen RWC, et al. Predictors of in-hospital mortality and attributable risks of death after ischemic stroke: the German Stroke Registers Study Group. *Arch Intern Med* 2004;164(16):1761–8.
- Hilker R, Poetter C, Findeisen N, Sobesky J, Jacobs A, Neveling M, et al. Nosocomial pneumonia after acute stroke: implications for neurological intensive care medicine. *Stroke* 2003;34(4):975–81.

- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenberg AA, et al. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(11):1798–805.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011;17(7):796–808.
- International Stroke Trial Collaborative Group. The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet* 1997;349(9065):1569–81.
- Johnston KC, Li JY, Lyden PD, Hanson SK, Feasby TE, Adams RJ, et al. Medical and neurological complications of ischemic stroke: experience from the RANTTAS trial. RANTTAS Investigators. *Stroke* 1998;29(2):447–53.
- Jönsson A-C, Lindgren I, Norrving B, Lindgren A. Weight loss after stroke: a population-based study from the Lund Stroke Register. *Stroke* 2008;39(3):918–23.
- Kalra L. Antibiotics to Prevent Infections in Stroke - A cluster randomised trial of different strategies of antibiotic use to reduce the incidence and consequences of chest infection in acute stroke patients with swallowing problems - STROKE-INF Study. (Identifier ISRCTN37118456, at: www.controlled-trials.com/ISRCTN37118456).
- Katsura K, Kristián T, Siesjö BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22(4):991–6.
- Katzan IL, Cebul RD, Husak SH, Dawson N V, Baker DW. The effect of pneumonia on mortality among patients hospitalized for acute stroke. *Neurology* 2003;60(4):620–5.
- Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2003;12(3):119–26.
- Klehmet J, Harms H, Richter M, Prass K, Volk HD, Dirnagl U, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 2009;158(3):1184–93.
- Kloos AD, Fisher LC, Detloff MR, Hassenzahl DL, Basso DM. Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2005;191(2):251–65.
- Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, et al. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 1995;4(5):311–7.
- Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1993;119(2):153–64.

- Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology* 2007;69(14):1404–10.
- Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, MacDonald J, Jones L, McAlpine C, et al. Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke* 2000;31(6):1223–9.
- Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010;375(9727):1695–703.
- Lindsberg PJ, Carpén O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996;94(5):939–45.
- Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 1991;30(2):117–29.
- Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics - 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009;119(3):e21–181.
- Lubjuhn J, Gastens A, von Wilpert G, Bargiotas P, Herrmann O, Murikinati S, et al. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 2009;184(1):95–103.
- Marik PE. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med* 2001;344(9):665–71.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 1994;17(6):251–7.
- Matthews JN, Altman DG. Interaction 3: How to examine heterogeneity. *BMJ* 1996;313(7061):862.
- Meisel A. Preventive antibiotic therapy in stroke : PASSed away ? *Lancet* 2015;6736(15):14–5.
- Meisel C, Meisel A. Suppressing immunosuppression after stroke. *N Engl J Med* 2011;365(22):2134–6.
- Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, et al. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke* 2004;35(1):2–6.
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(10):775–86.
- Mergenthaler P, Meisel a. Do stroke models model stroke? *Dis Model Mech* 2012;5:718–25.

- Metz GA, Wishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *J Neurosci Methods* 2002;115(2):169–79.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 2010;67(2):181–98.
- Nakagawa T, Sekizawa K, Nakajoh K, Tanji H, Arai H, Sasaki H. Silent cerebral infarction: a potential risk for pneumonia in the elderly. *J Intern Med* 2000;247(2):255–9.
- Nederkoorn PJ, Westendorp WF, Hooijenga IJ, de Haan RJ, Dippel DWJ, Vermeij FH, et al. Preventive antibiotics in stroke study: rationale and protocol for a randomised trial. *Int J Stroke* 2011;6(2):159–63.
- O'Collins VE, Macleod MR, Cox SF, Van Raay L, Aleksoska E, Donnan GA, et al. Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(3):962–75.
- Perry L, Love CP. Screening for dysphagia and aspiration in acute stroke: a systematic review. *Dysphagia* 2001;16(1):7–18.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 2003;198(5):725–36.
- Rieke K, Schwab S, Krieger D, von Kummer R, Aschoff A, Schuchardt V, et al. Decompressive surgery in space-occupying hemispheric infarction: results of an open, prospective trial. *Crit Care Med* 1995;23(9):1576–87.
- Rocco A, Fam G, Sykora M, Diedler J, Nagel S, Ringleb P. Poststroke infections are an independent risk factor for poor functional outcome after three-months in thrombolysed stroke patients. *Int J Stroke* 2012;8(8):639–44.
- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics - 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117(4):e25–146.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 1995;18(3):130–6.
- Scherbakov N, Dirnagl U, Doehner W. Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. *Stroke* 2011;42(12):3646–50.
- Schwarz S, Al-Shajlawi F, Sick C, Meairs S, Hennerici MG. Effects of prophylactic antibiotic therapy with mezlocillin plus sulbactam on the incidence and height of fever after severe acute ischemic stroke: the Mannheim infection in stroke study (MISS). *Stroke* 2008;39(4):1220–7.

- Sherman DG, Albers GW, Bladin C, Fieschi C, Gabbai AA, Kase CS, et al. The efficacy and safety of enoxaparin versus unfractionated heparin for the prevention of venous thromboembolism after acute ischaemic stroke (PREVAIL Study): an open-label randomised comparison. *Lancet* 2007;369(9570):1347–55.
- Sheth VR, van Heeckeren RC, Wilson AG, van Heeckeren AM, Pagel MD. Monitoring infection and inflammation in murine models of cystic fibrosis with magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2008;28(2):527–32.
- Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007;6(2):182–7.
- Thöne-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Scheffe JH, et al. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens* 2008;26(12):2426–35.
- Tizard I. Sickness behavior, its mechanisms and significance. *Anim Heal Res Rev* 2008;9(01):87–99.
- Ulm L, Ohlraun S, Harms H, Hoffmann S, Klehmet J, Ebmeyer S, et al. STROKE Adverse outcome is associated WITH NoSocomial Infections (STRAWINSKI): procalcitonin ultrasensitive-guided antibacterial therapy in severe ischaemic stroke patients - rationale and protocol for a randomized controlled trial. *Int J Stroke* 2012;8(7):598–603.
- Van de Beek D, Wijdicks EFM, Vermeij FH, de Haan RJ, Prins JM, Spanjaard L, et al. Preventive antibiotics for infections in acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Arch Neurol* 2009;66(9):1076–81.
- Vandeputte C, Taymans J-M, Casteels C, Coun F, Ni Y, Van Laere K, et al. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. *BMC Neurosci* 2010;11:92.
- Vrinten DH, Hamers FFT. ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 2003;102(1-2):203–9.
- Wang Y, Bontempi B, Hong SM, Mehta K, Weinstein PR, Abrams GM, et al. A comprehensive analysis of gait impairment after experimental stroke and the therapeutic effect of environmental enrichment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28(12):1936–50.
- Weimar C, Roth MP, Zillessen G, Glahn J, Wimmer MLJ, Busse O, et al. Complications following Acute Ischemic Stroke. *Eur Neurol* 2002;48(3):133–40.
- Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Vermeij J-D, Dijkgraaf MG, van de Beek D. Post-stroke infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol* 2011;11:110.
- Westendorp WF, Vermeij J-D, Zock E, Hooijenga IJ, Kruyt ND, Bosboom HJLW, et al. The Preventive Antibiotics in Stroke Study (PASS): a pragmatic randomised open-label masked endpoint clinical trial. *Lancet* 2015; (*epub ahead of print*)

-
- Woiciechowsky C, Schöning B, Cobanov J, Lanksch WR, Volk H-D, Döcke W-D. Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury and pneumonia in brain-injured patients. *J Trauma*. 2002 Feb;52(2):339–45.
- Young J, Forster A. Review of stroke rehabilitation. *BMJ* 2007;334(7584):86–90.
- Zhang R, Chopp M, Zhang Z, Jiang N, Powers C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1998;785(2):207–14.
- Zhang Z, Chopp M, Goussev A, Powers C. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1998;784(1-2):210–7.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Susann Hetze, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Präventive Antibiotikatherapie im Vergleich zur Standardtherapie des akuten ischämischen Schlaganfalls in einem präklinischen Modell* selbstständig und nicht ohne offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung („Uniform Requirements for Manuscripts“ des ICMJE) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und zu den Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an zu dieser Dissertation gehörenden Publikationen entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit meinem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort, Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Die Doktorandin Frau Susann Hetze hatte folgenden Anteil an den genannten Publikationen:

Publikation 1: Hetze S, Römer C, Teufelhart C, Meisel A, Engel O. Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. *Journal of neuroscience methods* 2012; 206(1):7-14.

Beitrag im Einzelnen: Selbstständige Entwicklung des experimentellen Studiendesigns, Durchführung der Experimente (Ganganalyse mit dem CatWalk System inkl. vorheriges Training der Versuchstiere, MCAO inkl. Vorbereitung der Filamente, MRT, tägliche Überwachung sowie Versorgung der Versuchstiere), Erhebung und Organisation der Rohdaten, gemeinschaftliche statistische Auswertung der erhobenen Daten (insb. schlaganfallsensitive Gangparameter), Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, Verfassen der Publikation und gemeinschaftliche Überarbeitung bis zur entsprechenden Finalversion.

Publikation 2: Hetze S, Engel O, Römer C, Müller S, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A. Superiority of preventive antibiotic treatment compared to standard treatment of post-stroke pneumonia in experimental stroke: A bed to bench approach. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 2013. 33(6):846–54.

Beitrag im Einzelnen: Selbstständige Entwicklung des Studiendesigns, Entwicklung neuer Methoden, Durchführung der einzelnen Experimente (MCAO inkl. Filamentherstellung, bakterielle Untersuchung der Lunge, Entnahme der Lungen mittels Thorakotomie, Lungen-MRT, Ganganalyse inkl. vorherigem Training der Versuchstiere, Entwicklung und Anwendung des allg. Gesundheitsscores der Maus, tägliche Versorgung und Überwachung der Versuchstiere mit Erhebung des MGHS sowie Verabreichung der Medikation, transkardiale Perfusion und anschließende Entnahme der Gehirne für die FACS Analyse), Erhebung und Organisation der Rohdaten, gemeinschaftliche statistische Auswertung der Daten, Interpretation der Ergebnisse, Literaturrecherche, Verfassen der Publikation und gemeinschaftliche Diskussion und Bearbeitung bis zur finalen Version, Bearbeitung des Reviewverfahrens.

Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift
der Doktorandin

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Originalarbeiten

Hetze S, Römer C, Teufelhart C, Meisel A, Engel O. Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. *Journal of neuroscience methods*. 2012; 206(1):7-14.

Hetze S, Engel O, Römer C, Müller S, Dirnagl U, Meisel C, Meisel A. Superiority of preventive antibiotic treatment compared to standard treatment of post-stroke pneumonia in experimental stroke: A bed to bench approach. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 2013; 33(6):846–54.

Konferenzbeitrag

“Preventive vs. therapeutic antibacterial therapy of post stroke infections in experimental stroke: translating an important clinical issue from bed to benchside”. Vortrag bei der *21th Europeans Students Conference 2010, Neurology Session* in Berlin.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Meisel danke ich für das Überlassen des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung, die die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat. Bei Herrn Odilo Engel möchte ich mich für die gemeinschaftliche Umsetzung bei den zahlreichen Experimenten als auch für die motivierte Zusammenarbeit bei den Publikationen herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Dirnagl möchte ich für die kritischen wissenschaftlichen Ratschläge danken. Bei Herrn Prof. Dr. Christian Meisel möchte ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und die kompetente Beratung inhaltlicher Fragestellung herzlich bedanken. Frau Christine Römer möchte ich ferner für die Unterstützung bei den immunologischen Untersuchungen danken. Für die Einführung und Beratung an dem Kleintier-MRT möchte ich mich bei Frau Dipl. ing. Susanne Müller bedanken. Sonja Hochmeister danke ich für die freundliche Bereitstellung von Untersuchungsdaten eines Versuchsdurchlaufes mit dem *CatWalk* System.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und der Abteilung für Experimentelle Neurologie für ihr vielfältiges Engagement bedanken, mein besonderer Dank geht hierbei an Mareike Thielke, Sabine Kolodziej, Carena Teufelhart, Solveig Flag, Claudia Conert und Verena Wörtman.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Familie, Freunden und Kollegen für ihre vielseitige Unterstützung.