Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Systemische Wechselbeziehungen zwischen dem ischämischen Schlaganfall und dem Herzen im Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Lilian Corinna Vornholz Tierärztin aus Düsseldorf

> > Berlin 2019 Journal-Nr.: 4104

Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Systemische Wechselbeziehungen zwischen dem ischämischen Schlaganfall und dem Herzen im Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lilian Corinna Vornholz Tierärztin aus Düsseldorf

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4104

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Herr UnivProf. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Frau UnivProf. Dr. Christa Thöne-Reineke
Zweiter Gutachter:	Herr Prof. Dr. Martin Sager
Dritter Gutachter:	Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): animal models, mice, heart, stroke, electrocardiogramms, ELISA, magnetic resonance imaging

Tag der Promotion: 20.05.2019

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über https://dnb.de abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-978-5 **Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019** Dissertation, Freie Universität Berlin **D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

1		Ein	leitu	ng	1
	1.	.1	Aku	ter ischämischer Schlaganfall	1
		1.1.	.1	Definition	1
		1.1.	.2	Ätiologie und Pathophysiologie	1
		1.1.	.3	Epidemiologie	2
	1.	.2	Kar	diovaskuläre Komplikationen nach einem akuten ischämischen Schlaganfall	2
	1.	.3	Entz	zündungsreaktionen nach einem akuten ischämischen Schlaganfall	4
	1.	.4	Нур	othese	5
	1.	.5	Ziel	setzung	5
2		Ver	such	nstiere, Material und Methoden	6
	2	.1	Vers	suchsaufbau	6
	2	.2	Vers	suchstiere	6
		2.2	.1	Experimentelles Schlaganfallmodell	7
		2.2	.2	Verhaltenstest / Scoring in der experimentellen Schlaganfallforschung	9
	2	.3	Kar	diovaskuläre murine <i>in vivo</i> Diagnostika	9
		2.3	.1	Transthorakale Echokardiograhie (TEE)	9
		2.3	.2	Elektrokardiogramm (EKG) / Herzfrequenzvariabilitätsanalyse (HRV)	.11
		2.3	.3	Magnetresonanztomographie (MRT)	. 12
		2.3	.4	Druck-Volumen-Messung	.13
	2	.4	Mur	ine <i>ex vivo</i> Analysen von Blut- und Geweben	. 16
		2.4	.1	Blut-/Organentnahme	. 16
		2.4	.2	Isoliert perfundiertes Herz (Langendorff)	. 18
		2.4	.3	Durchflusszytometrische Zellanalyse	.20
		2.4	.4	BioPlex Assay	.22
		2.4	.5	High Performance Liquid Chromotography (HPLC)	.22
		2.4	.6	"Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA)	.23
		2.4	.7	Histologie	.24
		2.4	.8	Statistik	.27
	2	.5	Mat	erialliste	.29
3		Erg	jebni	SSe	.40
	3.	.1	Мос	dellcharakteristika	.40
		3.1.	.1	Übersicht über Sterblichkeit, Biomarker und Insultgröße	.40
		3.1.	.2	Klinische Beurteilung des Schlaganfalls	.42
		3.1.	.3	Hirninsultgröße nach 60 Minuten transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie.	.43

	3.2	Bio	marker nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie	.44
	3.2	2.1	Hochsensitives Troponin T	.44
	3.2	2.2	Korrelationsanalyse von Insultgröße und hochsensitivem Troponin T	45
	3.3	Sys	temische und lokale Entzündungsreaktionen	47
	3.3	3.1	Blutuntersuchungen	47
	3.3	3.2	Untersuchungen der Milz	50
	3.3	3.3	Untersuchungen herzständiger Zellen	51
	3.4	Kat	echolamine	54
	3.5	Här	nodynamik	55
	3.	5.1	Aortale Blutdruckmessung	55
	3.	5.2	Druck- Volumenmessungen im linken Ventrikel	56
	3.6	Link	ksventrikuläre Herzfunktion nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie	58
	3.7	Elel	ktrokardiogramm (EKG)- Analyse	61
	3.8	Myo	okardiale Texturanalyse	63
	3.8	8.1	Magnetresonanztomographie	63
	3.8	8.2	Histologische Untersuchungen	64
4	Di	skuss	sion	66
	4.1	Ker	naussagen	66
	4.2	Klin	ische Relevanz und Variabilität des Modells	66
	4.3	Aus	wirkungen der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie	.67
	4.3	3.1	Troponinausschüttung nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie	.67
	4	.3.2	Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf die kardiale Funktion	.68
	4.3	3.3	Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf den Herzrhythmus	.68
	4.3	3.4	Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf die Hämodynamik	.70
	4	.3.5	Immunologische Veränderungen als mögliche Ursache kardiovaskulärer Ereignisse nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie	.72
	4.3	3.6	Anstieg des zirkulierenden Troponins auf Grund einer myokardialen Strukturschädigung	.73
5	Zu	ısamr	nenfassung und Ausblick	.74
6	Sı	umma	ry	75
7	Lit	teratu	rverzeichnis	76
8	Ar	nhang	J	.82
	8.1	Abk	kürzungsverzeichnis	82
	8.2	Abb	oildungsverzeichnis	.86

8	3.3	Tabellenverzeichnis	88
8	3.4	Formelverzeichnis	89
9	Pub	likationsverzeichnis	90
10	Dan	ksagung	91
11	Fina	anzierungsquellen / Interessenkonflikte	92
12	Sell	ostständigkeitserklärung	93

1 EINLEITUNG

Weltweit erleiden etwa 6,2 Millionen Menschen jährlich einen Schlaganfall. Bei 87 % der betroffenen Patienten liegt eine zerebrale Ischämie zugrunde.¹ Der Schlaganfall zählt zu den Haupttodesursachen in Deutschland und stellt eine Erkrankung mit oftmals schweren Verläufen und Folgebeeinträchtigungen dar.² Überraschenderweise erleiden 2/3 aller Patienten nach akutem ischämischen Schlaganfall (AIS) kardiovaskuläre Komplikationen, die mit einem Anstieg des kardialen Troponin Ts im Plasma einhergehen ³⁻⁶ und die krankheitsbezogene Mortalität unabhängig steigern.⁷

Die zugrundeliegende Pathophysiologie ist unklar, sodass bislang keine kardioprotektiven Strategien in der Akutphase nach einem ischämischen Schlaganfall etabliert werden konnten.

1.1 Akuter ischämischer Schlaganfall

1.1.1 Definition

Beim AIS entsteht eine umschriebene Minderperfusion des Hirngewebes, die klinisch häufig zu einem akuten, fokalen neurologischen Defizit führt.⁸ An das zentral liegende schwerperfusionsgestörte Gebiet grenzt ein minderperfundiertes Gebiet – die sogenannte Penumbra. Die Penumbra enthält im Gegensatz zum zentralen Ischämiebereich noch funktionsfähige Neuronen, die durch umgehend schnelle Reperfusionsmaßnahmen gerettet werden können.⁹

1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Einem AIS liegen verschiedene Ursachen zugrunde. Der Hauptanteil obliegt hier einer artherosklerotischen oder artherothrombotischen Stenose der extra- oder intrakraniellen hirnversorgenden Gefäße (ca. 85 %). Weitere Ursachen stellen systemische Embolien (meist kardialer Genese) sowie Mikroangiopathien dar.¹⁰

Grundsätzlich hängt das Ausmaß der Hirnschädigung von der Dauer der Ischämie und der Größe und Lokalisation des betroffenen Areals der Ischämie ab.

Gleich mehrere Faktoren führen hierbei zum direkten nekrotischen Zelltod: aufgrund der Minderdurchblutung kommt es zu einer zerebralen Hypoxie und Hypoglykämie. Die Neuronen wechseln von Funktions- auf Erhaltungsstoffwechsel bis letztendlich die Reserven an Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), die durch die Glykolyse bereitgestellt wurden, verbraucht worden sind.¹¹ Durch den Energieverlust kommt der Na⁺-/K⁺-Ionenaustausch zum Erliegen beziehungsweise wird stark vermindert, wodurch die Zellen depolarisieren und Ca²⁺ einströmt. Hierdurch kommt es durch Aktivierung von Proteasen zur Membranschädigung,

die den Zelluntergang zur Folge hat. Eine weitere Ursache für den massiven Ca²⁺-Einstrom ist eine erhöhte Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat, welcher zusätzlich zum nekrotischen Zelluntergang beiträgt.^{11, 12}

Die erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert darüber hinaus Phospholipasen, die durch freie Sauerstoffradikale zum Einen zur DNA-Fragmentierung mit nekrotischem Zelluntergang oder zum Anderen durch eine mitochondriale Schädigung zum apoptotischen Zelluntergang führen.¹¹

1.1.3 Epidemiologie

Die Inzidenz des AIS liegt bei 1,82/1000 Einwohner pro Jahr.¹³ Im Jahr 2000 lag in Deutschland der Anteil von Patienten mit einem Lebensalter über 65 Jahren bei 16 % bezogen auf die Gesamtbevölkerung, demnach sind ältere Patienten häufiger betroffen.¹³ Ausgehend von einer höheren Lebenserwartung und einem Wandel der Lebensweise wird laut Hochrechnung des statischen Bundesamts in Wiesbaden zukünftig mit einer weiteren Zunahme gerechnet werden müssen.¹³

1.2 Kardiovaskuläre Komplikationen nach einem akuten ischämischen Schlaganfall

Veränderungen des Elektrokardiogramms

Bereits 1947 berichteten Byer et al., dass Erkrankungen des Gehirns zu einer myokardialen Schädigung und Herzrhythmusstörungen führen können.¹⁴ Schlaganfallpatienten zeigen eine Vielzahl kardiovaskulärer Veränderungen, die neben der Schädigung des Hirns zur Erhöhung der Mortalitätsraten beitragen.¹⁵⁻¹⁸ Samuels et al. berichteten hierzu, dass Patienten nach einem ischämischen Schlaganfall eine Tachykardie und Arrhythmien aufweisen, die in einem möglichen Zusammenhang mit einer erhöhten Ausschüttung an stehen.¹⁵ Katecholaminen Ähnliche Beobachtungen konnten bei Patienten mit subarachnoidalen Blutungen gemacht werden, die gleichzeitig einen Anstieg von Troponin und "Brain"-Typ natriuretischem Peptid (BNP) zeigten.¹⁸ Bei der Mehrheit der Patienten mit einem AIS zeigten sich elektrokardiographische Veränderungen, wie ST-Senkung und T-Negativierung, sowie Rhythmusstörung, die einem Herzinfarkt ähneln, ohne dass Veränderungen der Koronargefäße festgestellt wurden.^{6, 19, 20}

Weitere beobachtete Veränderungen betreffen hauptsächlich die Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität (HRV). Diese äußern sich unter anderem in Form der o.g. Tachykardien, aber auch in unterschiedlichen zeitlichen Abständen zweier Herzschläge. Hierzu wurde schon früh der Verdacht auf eine autonome Dysregulation nach AIS geäußert: es ist bekannt, dass spezifische Hirnareale nach einem Schlaganfall zu einer autonomen Aktivierung führen.²¹ Eine zentrale Rolle für die autonome Dysregulation spielt hierbei die Inselrinde.²² In klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer ischämischen Schädigung der Inselrinde und Arrhythmien sowie einem Anstieg von Troponin gezeigt

werden.⁵ Insbesondere ein AIS der rechtshemisphärischen Inselrinde ist mit einer erhöhten Mortalitätsrate in Verbindung gebracht worden.²³ EKG-Veränderungen bei Schlaganfallpatienten weisen hierzu ebenfalls auf einen (rechtshemisphärischen) parasympathischen Effekt hin.²⁴

Troponin

Das Troponin ist ein Proteinbestandteil von Herzmuskelzellen, der bei Schädigung bzw. Zelluntergang jener in die Zirkulation übertritt und dort mittels hochsensitiver biochemischer Analyseverfahren nachgewiesen werden kann. Dieses Wissen macht man sich zu Nutze um jegliche kardiale Beteiligung an Krankheitsprozessen zu diagnostizieren.²⁵

Bei etwa 60 % der AIS Patienten kann bereits in der akuten Phase ein Anstieg von zirkulierendem Troponin gemessen werden. In diesem Patientenkollektiv wurde das Auftreten eines Troponinanstiegs in Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität gebracht.^{3, 26-28} Zudem konnte beobachtet werden, dass dynamische Troponin-Verläufe und Patienten mit rechtsseitigen Insulten eine weitaus höhere Mortalitätsrate aufweisen.^{3, 29}

Linksventrikuläre Funktion

Langzeitstudien konnten nachweisen, dass insbesondere systolische Funktionsbeeinträchtigungen nach AIS auftreten und innerhalb der ersten 3 Monate mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergehen.^{30, 31}

Ein Zusammenhang zwischen einer neurologischen Stressreaktion und einer linksventrikulären Dysfunktion wird zudem für die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie postuliert: hierbei kommt es vermehrt bei älteren Frauen zu einer linksventrikulären systolischen und 32 diastolischen Dysfunktion die, ähnlich zum akuten Koronarsyndrom, mit elektrokardiographischen Veränderungen und einer Erhöhung der kardialen Biomarker einhergeht. Ein Zusammenhang besteht hier möglicherweise mit der Hirn-Herz-Achse durch die Einflussnahme erhöhter Katecholaminausschüttung.^{15, 33}

"Myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries" (MINOCA) – der Herzinfarkt ohne koronare Obstruktionen

Der durch AIS induzierte Troponin-Anstieg entspricht in Verbindung mit den EKG-Veränderungen und globalen Wandbewegungsstörungen der universalen Herzinfarkt-Definition.^{34, 35} Hier werden mehrere Formen des Infarkts unterschieden:

- 1. Der Typ 1- Infarkt in Folge eines Gefäßverschlusses
- 2. Der Typ 2- Infarkt in Folge einer Angebots-/ Bereitstellungs- Dysbalance
- 3. Der Typ 3a- Infarkt nach perkutaner koronarer Intervention (PCI)
- 4. Der Typ 3b- Infarkt nach Koronararterien-Bypass (CABG)
- 5. Der Typ 4- Infarkt nach Herztod.

Der klinisch beobachtete Myokardschaden nach AIS kann in der Mehrzahl der Fälle der Kategorie 2 zugeordnet werden, da bei 75 % der AIS-Patienten mit erhöhtem hochsensitiven Troponin (hsTnT) angiographisch keine relevante Obstruktion der Koronargefäße nachgewiesen werden kann.¹⁹

Laut der *European Society of Cardiology* (ESC) erfüllen diese Patienten die Diagnosekriterien eines *"Myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries"*.³⁶ Dies wird definiert anhand eines laborchemischen Nachweises von erhöhten kardialen Biomarkern wie insbesondere hsTnT gepaart mit Symptomen eines akuten Herzinfarkts oder neu aufgetretenen infarkttypischen EKG-Veränderungen oder echokardiographisch neuen regionalen Wandbewegungsstörungen. Zudem ist für die Diagnose der angiographische Ausschluss einer koronaren Obstruktion von über 50 % notwendig.³⁶

1.3 Entzündungsreaktionen nach einem akuten ischämischen Schlaganfall

Bei ca. 60 % der AIS-Patienten zeigt sich eine lokale und systemische Reaktion des Immunsystems,^{37, 38} deren Ausmaß von der initialen Größe des Hirnschadens abhängt.^{39, 40}

Ablauf der Entzündungsreaktion

Der Untergang der Hirnzellen nach AIS führt lokal zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen stimuliert. Diese Botenstoffe aktivieren die Mikroglia und führen zu einer vermehrten Leukozyten-Adhäsion in den Hirngefäßen und letztendlich zur Infiltration dieser in das Parenchym. Hierdurch werden verschiedene Entzündungsmediatoren wie weitere Zytokine, Stickstoffmonoxid oder Metalloproteinasen gebildet, welche unter anderem den weiteren Zelluntergang sowie Blutungen und Ödembildung begünstigen.⁴¹

Die systemische Entzündungsreaktion nach AIS läuft biphasisch ab: der akuten Inflammation folgt eine Immunsuppression mit der Konsequenz einer erhöhten Inzidenz von Sekundärerkrankungen wie zum Beispiel Pneumonien in der subakuten Phase nach AIS. Hierbei spricht man von der sogenannten schlaganfallinduzierten Immunsuppression ("stroke-induced immunodepression", SIDS), die in erster Linie durch das autonome Nervensystem vermittelt wird.³⁷ Zu den wesentlichen Charakteristika zählen eine Erhöhung der Akute-Phase-Proteine (C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) und Serum-Amyloid-Protein (SAP)) und im weiteren Verlauf eine Lymphopenie, welche sekundäre Komplikationen unterstützten.³⁸ AIS-Patienten weisen hierbei vor allem respiratorische Sekundärkomplikationen wie Pneumonien oder auch renale Folgeerkrankungen wie Harnwegsinfekte auf.^{42, 43} 61 % der AIS-Patienten entwickeln innerhalb von drei Tagen Fieber ⁴⁴, hauptsächlich aufgrund von Infektionen ⁴⁵, welches mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht.⁴⁶ Hierzu konnte in großen Kohortenstudien gezeigt werden, dass Entzündungsmarker wie das CRP ⁴⁷ und IL-6 ⁴⁸ die Mortalität sogar prognostizieren.

Für die vorliegende Arbeit war es wichtig, dass klinische und experimentelle Daten neuroinflammatorische Wechselwirkungen auch zwischen dem ischämischen Hirn und dem Herzen vermuten lassen.⁴⁹

1.4 Hypothese

Die Wechselwirkungen zwischen ischämischem Hirninfarkt und Herz sind bislang pathophysiologisch nicht hinreichend aufgeklärt.

Vor dem Hintergrund der genannten Einzelbefunde stellen wir die Hypothese auf, dass nach einem AIS immunologische Wirkmechanismen und autonome Dysregulation zu einer myokardialen Schädigung und hiermit einhergehend zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führen.

1.5 Zielsetzung

Es wurden bereits verschiedene heterogene Tiermodelle zur Induktion eines Schlaganfalls etabliert, dennoch können diese den menschlichen Phänotyp nicht hinreichend oder nur annähernd imitieren.⁴

Lubjuhn et al. berichteten in diesem Zusammenhang, dass in der Schlaganfallforschung der Transfer von Ergebnissen aus Tierversuchen in die Klinik, bedingt durch die Besonderheiten in den Tiermodellen, nicht immer erfolgreich ist.⁵⁰

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines experimentellen Modells, welches die klinischen Beobachtungen in der Akutphase bestmöglich widerspiegelt und zur Aufklärung möglicher Mechanismen zwischen AIS und dessen kardiovaskulärer Funktionsstörungen dient.

2 VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Wie in *Abbildung 1* schematisch dargestellt, wurde zur Untersuchung der kardiovaskulären Auswirkungen nach einem AIS folgender Versuchsaufbau gewählt: bei jungen, gesunden Mäusen wurde operativ ein einstündiger ischämischer Schlaganfall durch eine transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie ("transient middle cerebral artery occlusion") (tMCAO) induziert. Anschließend wurde das Stromgebiet für 24 Stunden reperfundiert und der kardiovaskuläre Phänotyp anhand verschiedener Methoden, die im Laufe dieser Arbeit beschrieben und diskutiert werden, untersucht.



Abbildung 1 Versuchsaufbau zur Untersuchung des kardiovaskulären Phänotyps nach einem akuten ischämischen Schlaganfall

Bei jungen, gesunden Mäusen (Baseline) wurde experimentell zum Zeitpunkt Oh ein ischämischer Schlaganfall durch eine transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie ("transient middle cerebral artery occlusion") (tMCAO) induziert (Ischämie). Nach 1h wurde das Stromgebiet reperfundiert (Reperfusion) und weitere 24h post OP der kardiovaskuläre Phänotyp untersucht.

2.2 Versuchstiere

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell und alle hierin enthaltenen Versuche wurden von der hiesigen Landesbehörde (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, (LANUV NRW)) unter dem Titel "Systemische Interaktionen zwischen ischämischen Schlaganfall und Myokardinfarkt im Mausmodell" mit dem Aktenzeichen "AZ 84-02-04-14.A338" am 30.04.2014 genehmigt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche C57BL/6J Mäuse (Lieferant Janvier) im Alter von 12 bis 14 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 24 und 30 g.

Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorschriften in einer Gruppengröße von 5 Tieren in Käfigen vorgeschriebener Größe auf Holzspänen bei einer

Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und 50 ± 10 % relative Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter in Form von Pellets (Standardfuttermittel für Mäuse der Firma Ssniff) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Unterbringung und Pflege der Tiere erfolgte durch Fachpersonal in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden in einem Haltungsraum mit einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten, der nach den Richtlinien der "Federation for Laboratory Animal Science Associations" (FELASA) Empfehlungen unter einem striktem Hygienemanagement regelmäßig gesäubert und desinfiziert wurde. Jedes Quartal wurde der Hygienestatus gemäß den FELASA Empfehlungen stichprobenartig ermittelt. Das Betreten des Raumes erfolgte ausschließlich durch fachkundige und wissenschaftlich autorisierte Personen.

Die medizinische Versorgung wurde durch den stellvertretenen Versuchsleiter mit Unterstützung von Veterinärmedizinern der ZETT sichergestellt.

2.2.1 Experimentelles Schlaganfallmodell

Transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie ("transient middle cerebral artery occlusion" (tMCAO))

Die hier angewendete Methode wurden durch *Clark et al.* 1997 erstmals beschrieben.⁵¹

Zur Induktion des Schlaganfalls wurde die Maus zunächst inhalativ mit einem Gasgemisch aus 1,5 Vol.-% Isofluran (Isofluran-Piramal®, Piramal Healthcare, UK) und 40 % Sauerstoff in Raumluft mittels Maske anästhesiert. Eine Analgesie erfolgte direkt nach erfolgreicher Narkoseeinleitung subkutan durch Buprenorphin (0.05 mg/kg) (Temgesic®, Indivior, UK).

Das Tier wurde zunächst auf einem auf 38 °C erwärmten Operationstisch in Rückenlage fixiert.

Nach erfolgter Rasur und Hautdesinfektion (Octenisept®, Schülke, Deutschland) des ventralen Halsgebietes wurde median eine 10-15 mm lange Hautinzision gesetzt und die rechte *Arteria (A.) carotis communis* mit ihrer Aufgabelung in die *A. carotis interna* und *externa* aufgesucht und freigelegt. Eine schematische Beschreibung ist hierzu in *Abbildung 2 (Seite 8)* zu sehen. Es folgte je eine Ligatur der *A. carotis communis* und der *A. carotis externa* mittels 4-0 Seide (4/0 Perma-Hand Seide, 1,5 metric, Ethicon). Durch einen dritten Faden wurde die *A. carotis interna* angeschlungen, welcher nach Anheben die Blutzufuhr des Gefäßes temporär unterband. Mittels einer kleinen Inzision der *A. carotis communis* wurde ein silikonummantelter 6-0 Faden (6-0 medium MCAO suture L910 PK10, Doccol corporation, Sharon, United States) eingelegt und über die *A. carotis interna* kopfwärts bis zum Anfangsabschnitt der mittleren Cerebralarterie vorgeschoben, um diese zu verschließen. Der vorgeschobene Faden wurde in der *A. carotis interna* fixiert und dort für 60 Minuten belassen. Die Narkose wurde nach Hautverschluss mittels 4-0 Seide (Perma-Hand™, Ethicon, USA) unterbrochen und das Tier unter einer Wärmelampe bei etwa 37 °C zurück in einen Käfig gesetzt. Die Narkosedauer betrug hierbei etwa 15 Minuten.

Kurz vor Ablauf der 60 Minuten wurde erneut die Narkose eingeleitet. Nach Eröffnung der Haut erfolgte die Entfernung des eingelegten Fadens mit zu erwartender Reperfusion der mittleren Hirnarterie. Anschließend wurde die *A. carotis interna* abgebunden, um eine Blutung aus der Inzision zu unterbinden. Die Haut wurde wieder mittels 4-0 Seide verschlossen, die Narkose beendet und das Tier zurück in den Käfig gesetzt. Die Eingriffsdauer betrug hierbei etwa 10 Minuten. Um das Fress- und Trinkverhalten zu gewährleisten, wurden eine Wasserschale sowie das Futter auf dem Boden angeboten. Postoperativ wurde alle 8 Stunden durch subkutane Verabreichung von Buprenorphin (0,05 mg/kg) der Wundschmerz in Folge gelindert.

Die Sham-Operation erfolgte unter gleichen Bedingungen: hierbei wurde nach Anästhesie und Analgesie vergleichend eine Inzision der Haut im ventralen Halsbereich vorgenommen und die *A. carotis communis* mit ihrer Aufgabelung in die *A. carotis interna* und *externa* aufgesucht. Nach jeweiliger Ligatur der *Arteriae* (*Aa.*) *carotis communis* und *externa* wurde die *A. carotis interna* angeschlungen. Er folgte eine Inzision der *A. carotis communis* ohne Einlegen des tMCAO-Fadens und letztlich eine Ligatur der *A. carotis interna*. Nach Hautverschluss wurde die Narkose für 60 Minuten unterbrochen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Tier erneut narkotisiert, die Hautnaht eröffnet und die beschriebenen Gefäße aufgesucht. Die Operation wurde nach erneutem Verschluss der Haut beendet und das Tier in den Käfig gesetzt. Die Tiere erhielten ebenfalls alle 8 Stunden 0.05 mg/kg Buprenorphin zur postoperative Schmerzstillung.



Abbildung 2 Schematische Zeichnung der Operationsmethode der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zur Schlaganfallinduktion bei der Maus

Links: Dargestellt ist eine Maus in Rückenlage, im Fokus das Operationsgebiet.

Mitte: Operationsgebiet: im unteren Abschnitt ist die Arteria (A.) carotis communis dargestellt, die sich in A. carotis externa und interna aufgabelt. Die A. carotis interna hirnwärts folgend wurde die A. cerebri media rot beschriftet abgebildet. Nach Ligatur der A. carotis communis und externa, und Anschlingen der A. carotis interna, erfolgte eine Inzision der A. carotis communis durch die der tMCAO-Faden eingelegt wurde.

Rechts: Darstellung des eingelegten und fixierten tMCAO-Fadens, der die A. cerebri media okkludiert.

2.2.2 Verhaltenstest / Scoring in der experimentellen Schlaganfallforschung

Jedes tMCAO- und Sham-operierte Tier wurde direkt nach dem vollständigen Erwachen aus der Narkose sowie 24 Stunden nach der Operation adspektorisch und taktil untersucht und beurteilt. Diese erfolgte anhand eines "Score Sheets" mit vorbestimmten Abbruchkriterien. Hierbei wurden das Körpergewicht, der Allgemeinzustand und das Spontanverhalten bewertet.

Zur klinisch-neurologischen Beurteilung des Schlaganfallmodells stehen eine begrenzte Anzahl an sensorischen, motorischen und Gedächtnisstörungs-Tests zur Verfügung, welche ein Abschätzen des Schlaganfallausmaßes bzw. des kontralateralen Defizits ermöglichen.

Bei diesen Versuchen wurde sich an dem globalen neurologischen Test nach *Bederson et al.* ⁵² orientiert *(Tabelle 1)*. Hierbei wurde die Vorderpfoten-Flexion, die Reaktion auf laterale Berührung der betroffenen Körperseite und die Kreisbewegung am sitzenden Tier beurteilt.

Einstufung	Schweregrad	Defizit
normal	0	Keine sichtbare Beeinträchtigung
mäßig	1	Vorderpfotenflexion
schwer	2	Verschlechterung der taktilen Reaktion auf seitliche Berührung; Vorderpfotenflexion ohne kreisende Bewegung
sehr schwer	3	wie Grad 2 mit kreisender Bewegung

Tabelle 1 Klinisch- neurologisches Bewertungssystem nach einem Schlaganfall nach Bederson 52

2.3 Kardiovaskuläre murine *in vivo* Diagnostika

2.3.1 Transthorakale Echokardiograhie (TEE)

Bilddatenakquise

Zur Echokardiographie der Maus stand ein Vevo 2100-Echokardiographiegerät mit einem MS-400 Schallkopf der Firma VisualSonics (FUJIFILM, Japan) zur Verfügung.

Zur Untersuchung wurde die Maus zunächst inhalativ mit 1,5 Vol.-% Isofluran und 40 % Sauerstoff in Raumluft in einer Narkosekammer anästhesiert. Nach ausreichender Narkosetiefe wurde das Tier auf einen auf 38 °C erwärmten Tisch gelegt und fixiert. Es folgte eine Rasur des ventralen Thoraxbereiches. Hiernach wurden Standardschnitte des Herzens (parasternale lange Achse *(Abbildung 3)*, kurze Achse in B- und M-Mode und Flussprofile oberhalb der Mitralklappen sowie oberhalb der Aortenklappen) aufgenommen.⁵³



Abbildung 3 Veranschaulichung eines Mäuseherzens in der parasternalen Längsachse in der Echokardiographie

A) Schematische Abbildung eines Mäuseherzens in der parasternalen Längsachse.

RV= rechter Ventrikel LV= linker Ventrikel LVOT= linksventrikulärer Ausflusstrakt LA= linker Vorhof

B) B-Mode-Aufnahme aus der transthorakale Echokardiographie (TEE) eines Mäuseherzens in der parasternalen Längsachse beispielhaft dargestellt. Der weiß gepunktete Bereich markierte den linken Ventrikel.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte im 2.2.0 VevoLab-Programm. Die endo- und epikardialen Begrenzungen wurden hierbei manuell eingezeichnet, das Schlagvolumen (µI) (SV) (*Formel 1*), das Herzzeitvolumen (mI/min) (HZV) (*Formel 2, Seite 11*), sowie die durchschnittliche Verkürzung (Fractional Shortening (%) (FS)) (*Formel 3, Seite 11*) und die Ejektionsfraktion (%) (EF) (*Formel 4, Seite 11*) sowie das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV und EDV) des linken Ventrikels hingegen automatisch gemessen und errechnet.

Formel 1 Berechnung des Schlagvolumens:

SV $(\mu l) = EDV (\mu l) - ESV (\mu l)$

Formel 2 Berechnung des Herzzeitvolumens:

HZV
$$\left(\frac{\mathrm{ml}}{\mathrm{min}}\right)$$
 = Herzfrequenz $\left(\frac{1}{\mathrm{min}}\right) * \mathrm{SV} (\mu \mathrm{l}) * 0.001$

Formel 3 Berechnung der fraktionellen Verkürzung:

$$FS (\%) = \frac{EDV (\mu l) - ESV (\mu l)}{EDV (\mu l)} * 100$$

Formel 4 Berechnung der Ejektionsfraktion:

$$EF(\%) = \frac{SV(\mu l)}{EDV(\mu l)} * 100$$

Aus den TEE Bildern wurde zusätzlich noch eine Analyse der myokardialen Verformung durchgeführt. Dies erfolgte "offline" durch einen Software-Algorithmus (VevoStrain-Programm von VisualSonics in der Parasternalen Längsachse) nach der "speckle tracking" Methode. Hierbei werden myokardiale Muster über die Zeit verfolgt. Es entstehen Verformungskurven (Strainkurven), die longitudinal, zirkumferentiell und radial ausgewertet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf den longitudinalen Strain beschränkt.

Zur Bestimmung der systolischen Funktion wurde der globale longitudinale Strain (GLS) des Herzens ausgewertet. Hierbei ist konventionsgemäß der pessimale Wert der Strainkurve derjenige der maximalen Segmentverkürzung. Der Mittelwert aller Herzsegmente stellt hierbei den globalen longitudinalen Strain dar.

Zur Bestimmung der diastolischen Funktion wurden die ersten Ableitungen der Strainkurven (Strain Rate) berechnet. Der erste Anstieg der Strain Rate stellt die frühen diastolischen passiven Rückstellkräfte dar (E-Welle) und wird allgemein als Maß für die diastolische Verformung angenommen.⁵⁴

2.3.2 Elektrokardiogramm (EKG) / Herzfrequenzvariabilitätsanalyse (HRV)

Die EKG-Aufzeichnung erfolgte prä-, intra-, sowie unmittelbar postoperativ und nach 24 Stunden.

Die Ableitung des EKGs wurde unmittelbar nach suffizienter Anästhesie des Tieres durch Klemmelektroden an den Vorderpfoten sowie einer Hinterpfote, PowerLab (8/30, adinstruments, Dunedin, Neuseeland), gestützt durch die LabChart Pro 7-Software (adinstruments, Dunedin, Neuseeland), dokumentiert.

Für die Auswertung der Herzfrequenz und ihrer Variabilität stand ein zusätzliches "heart ratevariability" (HRV) Tool der Software zur Verfügung. Diese Methode diente der Überprüfung der autonomen Regulation des Herzens.

Des Weiteren wurde anhand einer manuellen Auswertung der Quotient aus den jeweiligen Zeitpunkten der R- und S-Segmente gebildet, wobei Sham-operierte und tMCAO-operierte mit einer Erhöhung von hsTnT ≥14 ng/l eingeschlossen wurden.

2.3.3 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT-Untersuchung diente als nicht-invasive Methode der Darstellung der 3D-Morphologie von Hirn und Herz sowie der kardiovaskulären Funktionen tMCAO- und Sham-operierter Mäuse.⁵⁵ MRT ist der Goldstandard zur Messung kardialer Volumina und Dimensionen.⁵⁶ Zudem kann sie die magnetischen Gewebeeigenschaften des Herzens ermitteln (T1- und T2-Relaxationseigenschaften). Hierüber kann eine Aussage über das Bindegewebe und myokardiale Ödembildung getroffen werden.⁵⁷

Aufbau

Bei dem verwendeten MRT-Scanner handelte es sich um ein Bruker 9.4 T AVANCE III WB NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland). Dieser ist im Institut der Molekularen Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf installiert.

Die Messungen wurden in Kooperation mit Hr. Prof. Dr. U. Flögel (Institut für Molekulare Kardiologie, Cardiovascular Research Institute Düsseldorf, CARID) durchgeführt.

Vorbereitung

Die Maus wurde mit 1,5 Vol.-% Isofluran und 40 % Sauerstoff in Raumluft narkotisiert und in Abhängigkeit des zu untersuchenden Organes in der Spule positioniert. Die Erhaltung der Körpertemperatur wurde innerhalb des MRT-Scanners mit Hilfe einer Wärmepumpe gewährleistet.

Mittels eines M1025 Systems (SA Instruments, Stony Brook, USA) wurden zwecks Überwachung der Vitalparameter sowohl das EKG-Signal als auch die Respirationsrate durch Elektroden an den Vorder- und Hinterpfoten abgeleitet.

Bildgebung

Nach Einführung des Probenkopfs in den Magneten erfolgten jeweils Aufnahmen von Pilotscans, die der Orientierung dienten. Eine Messung dauerte insgesamt etwa 60 Minuten.

MRT des Herzens

Zur Beurteilung der kardialen Funktion (EF, CO) und Geometrie (EDV, ESV, SV) wurden EKG getriggerte Cine-FLASH-Sequenzen über den gesamten Herzzyklus aufgenommen.⁵⁸

Ohne die Verwendung von Kontrastmittel wurde zudem mit Hilfe sogenannter "parametrischer mapping"-Verfahren die T1- und T2-Relaxationszeit des Myokards gemessen, welche magnetische Gewebeeigenschaften des Myokards widerspiegeln.⁵⁹

Bildgebung des Gehirns

Hierbei erfolgte eine serielle Aufnahme von T2-gewichteten "Spinecho-Bildern." Diese ermöglichten eine optimale Kontrastdemarkation des Hirninfarktes ⁶⁰ (*siehe Abbildung 4*).



Abbildung 4 Magnetresonanztomographie (MRT)-Bild eines Mäusehirns 24 Stunden nach transienter Mediaokklusion

Hier zu sehen ist eine exemplarische Darstellung eines T2-gewichteten Spinecho-Bildes eines Mäusehirnschnitts in einer Transversalebene. Die weiß gepunktete Linie markierte den ischämischen Bereich.

Nach Beendigung der Messungen wurden die Mäuse bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose in einem Käfig unter einer Wärmequelle gehalten.

2.3.4 Druck-Volumen-Messung

Aufbau

Die Methode zur Druck-Volumen-Messung in der Maus wurde bereits durch *Erkens et al.* ⁵³ beschrieben und erlaubt ein genaues Monitoring der hämodynamischen Parameter in der Aorta und im Herzen.

Die Messung wurde 24 Stunden sowohl nach Schlaganfallinduktion als auch nach Sham-Operation über die rechte *A. carotis communis* vorgenommen. Hierzu stand ein 20 cm langer Mikro-Tip® Katheter (Modell SPR-1000, Millar instruments, USA) mit einem entsprechenden Druck- und Volumen Transducer der Firma Millar Instruments zur Verfügung.

Die Datenaufzeichnung erfolgte über die iox 2-Software (EMKA, Frankreich).

Die Versuche wurden mit der Unterstützung von der veterinärmedizinisch-technischen Assistentin Frau Stefanie Becher aus dem Kardiologischen Labor des Uniklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Versuchsdurchführung

Die am Standort bereits etablierte Methode sah zunächst eine gewichtsadaptierte, subkutane Analgesie der Maus mit Buprenorphin (0,05 mg/kg) vor.

Nach 30 Minuten wurde das Tier inhalativ mit 3 Vol.-% Isofluran narkotisiert und mit einem Venenverweilkatheter (Vasofix® Safety 20G, Braun, Deutschland) intubiert und anschließend auf dem Rücken liegend mit dem Kopf zum Operateur auf einem auf 37 °C erwärmten Operationstisch fixiert. Mittels eines murinen Respirators (UNO Micro Ventilator-03, UNO, USA) wurde die Atmungsfrequenz auf 140 Züge/min und ein Atemzugvolumen auf 250 µl eingestellt.

Im Verlauf der Messung wurde die Narkose mittels 2 Vol.-% Isofluran aufrechterhalten.

Es folgte eine 1,5 cm lange Hautinzision auf der rechten Halsseite in Höhe des Kehlkopfes.

In Anlehnung an die tMCAO-Operation wurde die rechte *A. carotis communis* unter Schonung der umliegenden Gefäße und Nerven (insbesondere des *Nervus vagus*) dargestellt.

Circa 1 cm unterhalb der bereits bestandenen Ligatur der *A. carotis communis* wurde eine Gefäßklemme platziert.

Im nächsten Schritt wurde innerhalb des abgebundenen Gefäßteils vorsichtig eine Inzision der Gefäßwand vorgenommen und der Druck-Volumen-Katheter eingeführt (Abbildung 5).



Abbildung 5 In vivo-Aufnahme einer Millar-Katheter-Untersuchung in der Maus

Dieser Bildausschnitt wurde während der Einführung eines Millarkatheters in die rechte Arteria (A.) carotis communis bei einer Maus in Rückenlage zwecks Aufzeichnung einer Druck-Volumen-Kurve aufgenommen. Nach Öffnung der kranial positionierten Gefäßklemme wurde der Katheter vorsichtig vorgeschoben bis das entsprechende Blutdrucksignal der Aorta erfasst wurde *(Abbildung 6)*. Erfasst wurden der systolische (P_{sys}), der diastolische (P_{dias}) und der mittlere arterielle Druck (MAP).





Abbildung 6 Blutdruckkurve einer Maus gemessen mit einem Millarkatheter-System

In dieser Abbildung wird beispielhaft ein Ausschnitt einer Blutdruckaufzeichnung gezeigt, die in der Maus mit einem Millarkatheter-System aufgezeichnet wurde.

 P_{sys} = systolischer arterieller Blutdruck P_{dias} = diastolischer arterieller Blutdruck MAP = mittlerer arterieller Blutdruck

Die Berechnungen des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und des totalen peripheren Widerstands (TPR) wurden nach den u.g. Formeln durchgeführt *(Formel 5 und Formel 6).*

Formel 5 Berechnung des mittleren arteriellen Drucks (MAP):
MAP (mmHg) = Diastolischer Druck (mmHg) + ¹/₃ (systolischer Druck (mmHg))
– diastolischer Druck (mmHg))

Formel 6 Berechnung des totalen peripheren Widerstands (TPR):

 $TPR \left(\frac{mmHg}{ml/min}\right) = \frac{Mittlerer arterieller Druck (MAP) (mmHg)}{Herzzeitvolumen (CO) (ml/min)}$

Nach Beendigung der Aufzeichnung wurde der Katheter weiter über die Aortenklappe bis in den linken Ventrikel vorgeschoben.

Hier erfolgte die Aufzeichnung der Ventrikel-Druckkurven *(Abbildung 7).* Erfasst wurden der endsystolische (ESP) und enddiastolische Druck (EDP).



Abbildung 7 Druckkurve im linken Ventrikel einer Maus gemessen mittels eines Millarkatheter-Systems

In dieser Abbildung wurde beispielhaft eine Druckkurve dargestellt, die im linken Ventrikel (LV) einer Maus mittels eines Millarkatheter-Systems aufgezeichnet wurde.

ESP = endsystolischer Druck EDP = enddiastolischer Druck dP_{max} = systolische Druckgeschwindigkeit dP_{min} = diastolische Druckgeschwindigkeit

Nach Abschluss der Messung erfolgte die Tötung des Versuchstiers durch Entbluten in tiefer Narkose.

Das Blut sowie das Gehirn und die Milz wurden für weitere Analysen entnommen.

2.4 Murine ex vivo-Analysen von Blut- und Geweben

2.4.1 Blut-/Organentnahme

Blutentnahme

Hierzu wurde die Maus zunächst inhalativ mit 3 Vol.-% Isofluran und 40 % Sauerstoff in Raumluft anästhesiert. Mittels 25G-Kanüle (BD Eclipse, BD, USA) wurden intraperitoneal 0,2 ml Heparin-Natrium (25.000 I.E., Braun, Deutschland) verabreicht. Die Blutentnahme erfolgte mit einer zuvor heparinisierten Glaskapillare: durch eine Dreh-/ Druckbewegung wurde über den medialen Augenwinkel der retrobulbärliegende Venenplexus punktiert.

Es wurde ein Blutvolumen von bis zu 60 ml pro kg Körpermasse entnommen und zwecks weiterführender Analysen bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C in heparinbeschichteten 2 ml-Eppendorfgefäßen zentrifugiert.

Bestimmung von kardialem hsTnT

200 µl des gewonnenen Plasmas wurden zur Bestimmung des hsTnTs in das Zentrallabor des Uniklinikum Düsseldorfs eingereicht. Hier stand ein hsTnT-Immunoassay der Firma Cobas zur Verfügung.

Die Messergebnisse wurden in Nanogramm pro Liter angegeben.

Hämatologie

30 µl des Vollbluts wurden zur Bestimmung der Basisform (Kleines Blutbild) und des Differentialblutbilds in Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) -beschichtete Mini-Collect-Röhrchen (greiner bio-one, Österreich) überführt.

Die Messungen erfolgten in der "Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Hier stand ein Hämatologiegerät scil Vet abc Plus+ zur Verfügung.

Organentnahme und Präparation: Gehirn, Milz, Herz

Nach erfolgter Blutentnahme schloss sich direkt im Anschluss eine Sektion an. Hierfür wurde die Maus zunächst dekapitiert und die Kopfhaut dorso-median eröffnet. Die Eröffnung des Schädels erfolgte ausgehend vom Wirbelkanal mittels einer Schere durch laterale Schnitte. Die Schädeldecke (Kalotte) wurde mit Pinzetten vorsichtig abpräpariert. Nach Entnahme des gesamten Gehirns wurde das Großhirn mit Hilfe eines Schneideblocks (Kent Scientific, USA) transversal in 2 mm dicke Scheiben von rostral nach kaudal geschnitten. Jeder Schnitt wurde einzeln in 1%iger Triphenyl-tetrazolium-chlorid-Lösung (TTC) bei 37 °C für 5 Minuten ohne Lichteinfluss angefärbt.

Die Schnitte wurden aufsteigend von rostral nach kaudal auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe einer Kamera (Zeiss Axiocam) mit einem 105 mm großen Objektiv (Kiron) unter Angabe eines Millimetermaßstabs vorder- und rückseitig fotografiert (*Abbildung 8, Seite 18*).

Die planimetrische Bestimmung erfolgte nach *Kleinschnitz et al.* ⁶¹ unter Berücksichtigung der Ödemkorrektur mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Vitales Gewebe stellte sich hierbei rot, avitales Gewebe blass bzw. ungefärbt dar.



Abbildung 8 Triphenyl-tetrazolium-chlorid (TTC)-gefärbtes Großhirn einer Maus nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)

Hier wurden fünf TTC-gefärbte Transversalschnitte des Großhirns einer Maus 24 Stunden nach tMCAO abgebildet. Die Schnittdicke betrug 2 mm. Vitales Gewebe färbte sich bei dieser Färbung rot. Avitale Areale (hier: rechtshemisphär, thalamisch, hypothalamisch und kortikal) blieben ungefärbt (weiß umrandet).

Weiter wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle vorsichtig die Milz entnommen. Diese wurde je nach Weiterverwendung bei -196 °C schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder zwecks Zellvereinzelung durch einen 100 µm großen Filter homogenisiert und in FACS-Puffer überführt. Die Suspension wurde vorerst auf Eis gelagert und stand zur durchflusszytometrischer Analyse (siehe 2.4.3) zur Verfügung.

Das Herz wurde nach Eröffnung des Thorax zusammen mit den Lungenlappen von ventral herausgeschnitten und die Lungenanteile vorsichtig entfernt.

Anschließend wurde das Herz zweckmäßig präpariert und weiterverwendet (siehe 2.4.2 Langendorff) oder in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Isoliert perfundiertes Herz (Langendorff)

Zur Perfusion des Mäuseherzen stand eine Apparatur nach Langendorff, veröffentlicht durch *Bönner et al.* im Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung.⁶²

Die Versuchsdurchführung fand in Kooperation mit Fr. Dr. Christina Alter aus dem Institut für Molekulare Kardiologie statt.

Versuchsdurchführung

Zur technischen Vorbereitung wurde das Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Anlage mit zuvor hergestelltem Waschpuffer (siehe Materialliste) gespült.

Die zur enzymatischen Zersetzung des Herzgewebes benötigte Kollagenaselösung wurde in einem Verhältnis von 1,2 mg/ml Kollagenase (NB8 Serva, USA) in 1/5 Teil Hanks` Balanced Salt Solution (HBSS) (gibco, USA) zu 4/5 Teilen Waschpuffer angesetzt.

Nach technischer Vorbereitung wurde das Herz der zuvor narkotisierten Maus (Ketanest S, Pfizer, Deutschland; 100 mg/kg Körpergewicht und Xylazin 2 % Bernburg, medistar, Deutschland; 10 mg/kg Körpergewicht) zusammen mit den Lungenlappen entnommen und in 4 °C kaltem Waschpuffer verbracht. Die Lungenanteile wurden vorsichtig entfernt. Das Herz wurde von dem umliegenden Gewebe (Perikard, Thymus, Fettgewebe) befreit, sodass das Herz samt der *Aorta ascendens* und eines Anteils des Aortenbogens separat vorlag.

Im nächsten Schritt wurde das Herz mit der Aorta auf einer Kanüle aufgezogen. Hierbei wurde zunächst darauf geachtet, dass sich das Kanülenende vor den Koronarabgängen befand. In dieser Position wurde die Aorta vor dem Abgang der *A. carotis dexter* mittels einer Ligatur an der Kanüle fixiert.

Es erfolgte zunächst eine Perfusion mittels Waschpuffer für 5 Minuten, um das Herz frei von Blutzellen zu spülen.

Im direkten Anschluss erfolgte eine Perfusion mit 5 ml Kollagenaselösung, welche das Herz nach und nach bei stetigem Perfusionsdruck von 80 mmHg letztendlich verdaute. Nach Abfall des Drucks und somit erfolgreicher Zersetzung des Gewebes (in der Regel nach etwa 20 Minuten) wurde die Perfusion beendet und das Herz von der Apparatur abpräpariert.

Im Anschluss wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt und das Gewicht der Ventrikel bestimmt.

Zur Aufbereitung des Gewebes für die bevorstehende durchflusszytometrische Analyse wurden die Ventrikel in einem 2 %igem Bovinem Serum Albumin Puffer (Albumin Fraktion V; Roth) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 25 ml, in 10 ml und abschließend in 5 ml Stripetten (Costar, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) zerkleinert, sodass die Zellen schlussendlich dissoziiert vorlagen.

Nach Filtration durch einen zunächst 100 μ m großen Cell Strainer (BD, USA) wurde die Suspension bei 5 x g bei 4 °C für eine Minute zentrifugiert. Hierbei sedimentierten die Kardiomyozyten. Der entstandene Überstand wurde verwendet und nochmals durch einen 70 μ m großen Cell Strainer filtriert und zentrifugiert. Ebenso erfolgte eine Filtration durch einen 40 μ m großen Cell Strainer. Abschließend schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g bei 4 °C an.

Das gewonnene Zellpellet wurde nun mit 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und stand zur Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern für die Durchflusszytometrie (siehe 2.4.3) bereit.

2.4.3 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Bei der FACS-Analyse passieren (zuvor mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markierte) Zellen einer Einzelzellsuspension eine Kapillare ("flow cell"). Mit Hilfe eines Laserstrahls wird jede Zelle angeregt und das Streu- und Fluoreszenzlicht detektiert. Je nach Brechung des gestreuten Lichts unterscheidet man im Vorwärtsstreulicht (FSC="forward scatter") das Volumen der Zelle und im Seitwärtsstreulicht (SSC="sideward scatter") die Granularität der Zelle.

Am Standort stand ein Canto II (BD, Deutschland) zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo.

Präparation von Leukozytensuspensionen (FACS-Analyse)

Für die Analyse von zirkulierenden Leukozyten wurde zunächst 1 ml des Vollbluts für 10 min bei 300 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Ammoniumchlorid-Lösung ("Lysis Solution", Uniklinikum Düsseldorf, Deutschland) für 5 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden 8 ml FACS-Puffer (siehe Materialliste) hinzugefügt und die Suspension wurde bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der oben beschriebene Vorgang zweimal wiederholt. Nach erfolgter Auswaschung wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abpipiettiert und dieses in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert.

100 μ I der Suspension aus zirkulierenden oder organextrahierten Leukozyten wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1:25 μ I "FcR-blocking-solution" (Miltenyi, USA) in FACS-Puffer für 30 Minuten ohne Lichteinfluss bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung an den Zellen zu verhindern. Nach einem erneuten Waschschritt mit dem FACS-Puffer bei 300 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen erneut in 100 μ I FACS-Puffer aufgenommen.

Zur Färbung wurde die Suspension mit den entsprechenden Antikörpern (*Abbildung 9, Seite 21*), die zuvor in FACS-Puffer verdünnt wurden, versetzt und für 30 min im Kühlschrank (unter Ausschluss von Lichteinfluss) inkubiert.

Nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer wurde die Probe erneut bei 300 x g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Unmittelbar vor der Messung erfolgte abschließend die Zugabe von 1 µl DAPI bzw. 2,5 Ml 7-AAD, um tote Zellen zu markieren.



Abbildung 9 Schematische Darstellung der Antikörper und der Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analysen (FACS)

Hier wurde eine Übersicht der verwendeten Antikörper für die FACS-Analyse von Blut und Milz der lymphatischen (A) und der myeolischen (B) Zellreihe erstellt.

2.4.4 BioPlex Assay

Die Bestimmung von zirkulierenden und herzständigen Zytokinen erfolgte mittels BioPlex Assay (Firma BioRad, USA). Hierfür wurde folgendes "Panel" verwendet: IL-1ß, IL-6, IL-10, Interferon-γ und TNFα ("Mouse Cytokines Th17", BioRad, USA).

Die Detektion wurde hierbei sowohl in Blutplasma- als auch in Herzgewebeproben aus den jeweiligen Experimentalgruppen durchgeführt.

Die Aufbereitung der Herzen erfolgte mit einem zusätzlichen Gewebelyse-Kit der Firma BioRad ("BioPlex Cell Lysis Kit", BioRad, USA). Das Protokoll befolgend wurden die Herzen direkt nach der Entnahme in einem zuvor hergestellten Zelllysierungspuffer mit Hilfe eines Tissue Grinder homogenisiert und bei -80 °C tiefgefroren.

Zeitnah zur Messung wurde die Proteinkonzentration jedes Herzlysates mit Hilfe eines "Protein-Assay-Kits" der Firma BioRad ("DC Protein Assay", BioRad, USA) bestimmt, um den Referenzbereich des Zytokin-Assays einzuhalten.

Die Bestimmung erfolgte hierbei nach Zentrifugation der Lysate bei 10000 x g bei 4 °C für 4 Minuten im Überstand der Proben.

Nach entsprechender Verdünnung standen die Proben zur weiteren Analyse zur Verfügung.

In Anlehnung an das dem Kit beigefügten Protokoll wurden die Blutplasma- und Gewebeproben behandelt und mit Hilfe des BioPlex-Systems in Kooperation mit Frau Dr. Christina Alter im Institut für Molekulare Kardiologie gemessen.

2.4.5 High Performance Liquid Chromotography (HPLC)

Bei der HPLC handelt es sich um eine analytische Trennmethode, welche über einen chromatographischen Prozess kleinste Mengen von Substanzen quantitativ nachweisen kann. Dabei wird die zu trennende Substanz mit Hilfe eines Lösungsmittels (mobile Phase) durch eine Säule (stationäre Phase) gepumpt.

Je nach Reaktionsvermögen mit der stationären Phase treten die Bestandteile der Substanz zu unterschiedlichen Zeiten aus und werden mit Hilfe eines Detektors identifiziert.

Aufbau

Zur Bestimmung der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin stand eine HPLC-Anlage der Serie CLC 100-300 (Chromosystems, Deutschland) zur Verfügung.

Diese bestand aus einer Pumpe (CLC 300), welche mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute und einem Druck von 5 MPa die Förderung der mobilen Phase gewährleistete.

Ein Autosampler (CLC 200) ermöglichte die maximale Injektion von 120 Proben.

Eine Probenmenge von jeweils 50 µl wurde in einem Zeitabstand von 22,1 Minuten in die Säule (stationäre Phase) injiziert.

Durch die Interaktionen der Katecholamine mit der stationären Phase wurden die Komponenten zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluiert und mittels eines elektrochemischen Detektors (CLC 100) erfasst. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mit Hilfe einer Auswertungssoftware der Firma Chromosystems.

Versuchsdurchführung

Die Aufbereitung des Eluats erfolgte mit 200 µl Blutplasma der Mäuse.

Hierfür fand ein Katecholamin-Kit ("Catecholamines in Plasma – HPLC", Chromosystems, Deutschland) Anwendung. Dem beiliegenden Protokoll folgend wurden zunächst die Katecholamine aus den Plasmaproben extrahiert und der interne Standard zugegeben. Nach mehrmaligen Waschschritten erfolgte im Anschluss die Elution mittels des Elutionspuffers.

Im Verlauf der Versuchsreihen wurden in einem Durchgang durchschnittlich 15 Proben gemessen. Um möglichst konstante Messbedingungen zu schaffen, wurde das System 24 Stunden vor Messung mit entsprechender Flussgeschwindigkeit unter Einsatz der mobilen und der installierten stationären Phase (zwecks Equibillierung) eingespült. Ein Wechsel der Kaliumchlorid-Lösung des elektrochemischen Detektors fand je nach Normabweichung, in der Regel einmal wöchentlich, statt.

2.4.6 "Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

Katecholamine

Zur Kontrolle der Ergebnisse aus den HPLC-Messungen wurde ein "3-CAT-Research ELISA" (LDN, Deutschland) zur Bestimmung der zirkulierenden Katecholamine (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin) verwendet.

Es wurden 30 µl der Plasmaproben im doppelten Ansatz eingesetzt.

Das Ablesen und die Auswertung erfolgten an einem FLUOstar Omega Mikroplatten-Lesegerät mit Hilfe des OMEGA-Programms (Omega, BMG Labtech, Deutschland).

Versuchsdurchführung

Das Protokoll befolgend erfolgte in mehreren Schritten zunächst die Extraktion und Acylierung gefolgt von einer Enzymkopplung mit dem jeweiligen Antiserum über Nacht. Am Folgetag wurden die Enzymkonjugate mit dem Substrat hinzugegeben.

Die Auslesung erfolgte bei 450 nm Wellenlänge.

Anhand mitgelieferter Datenblätter wurden die Konzentrationen der einzelnen Parameter in die Auswertungssoftware übertragen und die Probenkonzentrationen kalkuliert.

Serum Amyloid P (SAP)

Um einen weiteren Entzündungsparameter in der Zirkulation zu untersuchen, wurde ein "Mouse SAP ELISA Kit" (GenWay Biotech, Inc., USA) angewendet.

Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Herrn Fabian Nienhaus aus dem Kardiologischen Labor der Uniklinik Düsseldorf durchgeführt.

Versuchsdurchführung:

In einer zuvor ausgetesteten Verdünnung von 1:100.000 µL wurden die Blutplasmaproben dem Protokoll entsprechend aufbereitet und bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

2.4.7 Histologie

Perfusion der Herzen und Fixierung der Herzen

Herzen, die der histologischen Untersuchung zugeführt werden sollten, wurden im Thorax mit Hilfe einer elektrischen Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute mit 4 °C kaltem "Phosphate buffered Saline" (PBS) zunächst gespült. Nach vollständiger Entnahme des Herz-Lungen-Pakets wurden die Lungenlappen entfernt und das Herz für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) verbracht.

Darauffolgend wurden die Herzen zwecks Entwässerung für 8 Stunden in 15 %ige und für 20 Stunden in 30 %ige Saccharose-NaCl-Lösung bei 4 °C verbracht.

Einbettung

Die Einbettung erfolgte unmittelbar nach der Entwässerung in TissueTek (TissueTek, Sakura) in 1,5 x 1,5 x 0,8 cm³ großen Einbettschälchen in -50 °C Methylbutan (Sigma-Aldrich, Deutschland) auf Trockeneis. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die Kammern mit Gefriermedium gefüllt waren.

Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryomikrotom

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte stand ein Leica-Kryomikrotom (Leica CM 3050 S, Deutschland) des Kardiologischen Labor der Uniklinik Düsseldorf zur Verfügung.

Die eingebetteten Proben wurden zunächst bei -23 °C Kammertemperatur 1 Stunde lang im Mikrotom gelagert, sodass die Proben die Umgebungstemperatur annahmen.

Es wurden jeweils 15 Schnitte einer Ebene mit einer Schnittdicke von 8 µm beginnend von der Apex bis zur Basis angefertigt. Zwischen den einzelnen Ebenen wurde ein Abstand von 0,15 mm eingehalten, sodass das Herz in insgesamt 7 Ebenen eingeteilt war.

Bei den verwendeten Objektträgern handelte es sich um Menzel-Gläser Superfrost-Plus der Firma Thermo Scientific.

Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

Um die Gewebemorphologie analysieren zu können wurden die Herzschnitte zunächst hinsichtlich ihrer Struktur in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, ihrer Vitalität mittels TTC-Färbung und möglichen Abbauprozessen mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung untersucht.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin dient der Anfärbung von sauren bzw. basophilen Strukturen, insbesondere der Zellkerne, und stellt sich blau dar.

Eosin hingegen färbt basische bzw. eosinophile Strukturen rot.

Versuchsdurchführung

Zunächst wurden die Gefrierschnitte 5 Minuten in Aceton (99,5 %, rein, vwr, Deutschland) fixiert.

Darauffolgend wurden die Objektträger für 3 Sekunden in Hämatoxylin (Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III, Merck, Deutschland) gefärbt.

Das anschließende Bläuen erfolgte unter Leitungswasser für 15 Minuten.

Im nächsten Schritt wurden die Gefrierschnitte für 5 Minuten in 0,5 % iger Eosin Lösung (Eosin-Lösung-G, 0,5 %, Merck, Deutschland) gefärbt und kurz abgespült.

Zwecks Entwässerung wurden die Objektträger anschließend in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 %) für jeweils 2 Minuten gegeben.

Nach zweimaliger Fixierung in Xylol für jeweils eine Minute wurden die Objektträger anschließend mit Entellan® MSDS (Merck, Deutschland) eingedeckelt und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Aufnahmen der Präparate und die Auswertung erfolgten mit Durchlicht an einem Leica-Mikroskop DM 4000 M (Leica, Deutschland) mit 40facher Vergrößerung (Software LAS V 3.7, Leica, Deutschland).

Apoptose-Färbung

Um mögliche apoptotische Prozesse im Myokard von tMCAO- und Sham-operierten Mäusen sichtbar zu machen wurde ein "In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red" (Roche, Deutschland) verwendet.

Die Versuche wurden im Institut für Stoffwechselphysiologie der Heinrich-Heine-Universität in Kooperation mit Frau Carina Henning durchgeführt.

Versuchsdurchführung:

Dem Protokoll folgend, wurden nach Vorbereitung der zu verwendenden Agenzien sowie der Geräte die Gefrierschnitte zunächst in PBS gewaschen und Proteinkinase K (gelöst in 10 nM Tris/HCL) aufgetragen.

Im Folgenden wurde das Herzgewebe mit 0,1 % Triton X/0,1 % "Tri-sodium-citrate dihydrate" permeabilsiert und mit dem "TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling (TUNEL)-Staining" für eine Stunde inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte mit PBS + 0,2 % Triton gewaschen.

Die Objektträger wurden zum Abschluss mit Fluoroshield eingedeckelt und bis zur anschließenden Mikroskopie im Dunkeln gelagert.

Die Auszählung der DAPI- und TUNEL-positiven Zellen erfolgte an einem Nikon Eclipse TI-S Mikroskop (Nikon, Japan) in 40facher Vergrößerung in jedem Schnitt manuell.

TTC-Färbung der Herzen

Um die Vitalität der Kardiomyozyten weiter zu untersuchen wurden Gewebeschnitte der Herzen angefertigt. Hierfür wurden die Herzen direkt nach Entnahme zunächst in Klarsichtfolie eingewickelt, um Gefrierbrand vorzubeugen und bei -20 °C für eine Stunde eingefroren.

Im nächsten Schritt wurden die Herzen mit Hilfe einer Pinzette und einer Rasierklinge aufwärts von der Apex ausgehend in 1 mm dicke Schnitte geschnitten und ohne Lichteinfluss einzeln für 5 Minuten in zuvor hergestellte 37 °C warme TTC-Lösung gegeben und anschließend fotografiert. (vgl. TTC-Färbung der Hirnschnitte, *Seite 20*).
2.4.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism verwendet.

Hierbei wurde im Vergleich von tMCAO- und Sham-Gruppen mit einer unabhängigen Variablen der "student`s t-Test" und bei zeitlichen Verläufen im Gruppenvergleich der "2-way-ANOVA mit Sidak`s Mehrfachsvergleichtest" angewendet. Vor Anwendung eines parametrischen Testverfahrens wurde auf Normalverteilung mit Hilfe des "Shapiro-Wilk"-Tests geprüft. Auf Grund von zu kleinen Gruppengrößen konnte dieser Test bei einer n-Zahl ≤7 nicht durchgeführt werden, sodass hier der nicht-parametrische "Mann-Whitney-U-Test" verwendet wurde.

Die Angabe eines p-Werts ≤0,05 wurde als "signifikant" angegeben.

Wurde keine Signifikanz festgestellt (p-Wert >0,05) wurde dies als "nicht signifikant (ns.)" aufgeführt.

Alle Werte wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Anhand einer Vier-Feldertafel wurde die diagnostische Genauigkeit sowie die Vorhersagewerte für die Beteiligung der *Insula-Cortex* in Abhängigkeit von hsTnT ermittelt. *Abbildung 10* stellt die Berechnung der Sensitivität, der Spezifität, des positiven prädiktiven Wertes und des negativen prädiktiven Wertes dar. Hierbei war A das Kollektiv der Tiere, die ein erhöhtes Troponin (≥14 ng/l) sowie eine Insulabeteiligung (Insultgröße ≥19 %) aufwies. B schloss Tiere ein, die eine Insultgröße ≥19 %, aber einen Troponinwert <14 ng/l hatten. Bei der Gruppe C war der Troponinwert ≥14 ng/l bei einer Insultgröße <19 %. Tiere in Gruppe D hatten einen Troponinwert von <14 ng/l und eine Insultgröße <19 % (*Abbildung 10, Seite 28*).



Abbildung 10 Vier-Feldertafel zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität und positiven und negativen Prädiktionswerten

Anhand der Vier-Feldertafel wurden für die Versuche die diagnostische Genauigkeit (Sensitivität und Spezifität) sowie die positiven und negativen Prädiktionswerte bezüglich einer Insulabeteiligung in Abhängigkeit von Troponin berechnet.

- A: Tiere, mit hochsensitivem Troponin T (hsTnT) ≥14 ng/l und einer Insultgröße ≥19 % (Insulabeteiligung)
- B: Tiere mit einem hsTnT <14 ng/l und einer Insultgröße ≥19 %
- C Tiere mit einem hsTnT ≥14 ng/l und einer Insultgröße <19 %
- D Tiere mit einem hsTnT <14 ng/l und eine Insultgröße <19 %

2.5 Materialliste

Medikamente

Handelsname	Firma	Pharmazentralnummer
Isofluran-Piramal®	Piramal healthcare	PZN 9714675
Heparin-Natrium 25.000 I.E.	Braun	PZN 03862340
Temgesic®	Indivior UK	PZN 345928
Ketanest® S	Pfizer	PZN 07829486
Rompun® (Xylazin), 2%	Bayer	PZN 01320422
Isoton. NaCl Lösung 0,9%	Boehringer Ingelheim	PZN 00809090

Desinfektionsmittel

Handelsname	Firma	Pharmazentralnummer
Octenisept®	Schülke	PZN 7830489

Chemikalien

Methode	Chemikalie	Firma	Bestellnummer
	Triphenyl-tetrazolium-chlorid	Sigma- -Aldrich	# T8877
TTC-Färbung	Di-Natrium-hydrogenphosphat-dihydrat	Merck	# 106342
	Di-Natrium-hydrogenphosphat-monohydrat	Merck	# 106346

Herstellung der 1%igen TTC-Lösung:

- <u>Puffer 1</u>: **14,2 g** Na₂HPO₄ (Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat) auf **1 Liter H₂O**_{Millipore}
- <u>Puffer 2</u>: **6 g** NaH₂PO₄ (Natriumdihydrogen-Phosphat-Monohydrat) auf **0,5 Liter H₂O**_{Millipore}
- 8 Teile Puffer 1(basisch) + 2 Teile Puffer 2 (Puffer 2 sauer)
- pH-Wert auf 7,4 einstellen
- 1 % Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid hinzugeben
- Lösung rühren lassen + lichtgeschützt aufbewahren

Methode	Chemikalie	Firma	Bestellnummer
	Kollagenase NB 8	Serva	# 17456.01
Langendorff	Hanks` balanced Salt solution (HBSS)	gibco	# 14025092
	Bovines Serumalbumin	Roth	# 8076.5

Puffer	Chemikalie	Menge	Firma	Bestellnummer
	Phosphate buffered Solution (PBS)	500 ml	Sigma- Aldrich	# D8537
FACS-Puffer	Fetales Kälber Serum (FCS)	2 %	Sigma- Aldrich	# 12133C
	Ethylendiamintetraessigsäu re (EDTA)	2 mM	Sigma- Aldrich	# E-5016

Puffer	Chemikalie	Menge	Firma	Bestellnummer
Waschpuffer	PBS	1 Liter	Sigma- Aldrich	# P5493-1L
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃₎	4 mM	Sigma- Aldrich	# S 5761
	HEPES	10 mM	Sigma- Aldrich	# H7006
	2,3-Butandion-Monoxim	30 mM	Sigma- Aldrich	# 112135

Glukose	11 mM	Sigma- Aldrich	# G5767
Ethylenglycol- -bis(aminoethylether)- -N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	0.3 mM	Roth	# 3054.2
Natrium-Chlorid (NaCl)	6.6 mM	vwr	# 27810.295
Kalium-Chlorid (KCl)	0.22 mM	Merck	# 1.04936.0500
Magnesium-Chlorid (MgCl ₂)·H ₂ O	0.1 mM	Sigma- Aldrich	# 208337
mit Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂) begast, pH 7.4			

Antikörper	Konjugat	Firma	Verdünnung in FACS-	Bestellnummer
			Puffer (µI)	
B 220	FITC	Miltenyi	1:100	# 130-102-228
CD 3	APC	Miltenyi	1:100	# 130-102-549
CD 4	PerCP-Cy5.5	Miltenyi	1:100	# 130-102-271
CD 8	APC-Cy7	Miltenyi	1:100	# 130-102-305
CD 11b	PerCp-Cy5.5	BD	1:100	# 550993
CD 25	PE-Cy7	Miltenyi	1:100	# 130-105-378
CD 45	APC-Cy7	BD	1:100	# 557659
CD 80	PE-Cy7	Miltenyi	1:100	# 130-102-372
CD 206	PE-Cy7	Miltenyi	1:100	# 130-100-152
F4/80	PE	Serotec	1:100	# MCA 497 PE
FoxP3	PE	BD	1:100	# 560408
IL-17	Alexa Fluor	BD	1:100	# 560224
Ly6c	APC	BD	1:100	# 560595
Ly6g	FITC	BD	1:100	# 551460
MHC II	PE-Cy7	BioLegend	1:100	# BLD-107630
NK 1.1	PE	BD	1:100	# 557391
TNF-α	PE-Cy7	BD	1:100	# 557644
lsotyp zu TNF- α: rat lgG1	PE-Cy7	BD	1:100	# 557645
DAPI		BD	1	# 564907
FcR-blocking		Miltenyi	1:10	# 130-092-575

Antikörper

	Antikörper	Konjugat	Firma	Verdünnung in FACS- Puffer (µl)	Bestellnummer
	CD 45	PE-Cy7	BD	1:400	# 561868
Antikörper- -Mix A	CD 11b	APC	Thermo Fisher	1:100	# 17-0112-82
	CD 11c	FITC	BD	1:100	# 553801

VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

	Ly6g	PE	BD	1:100	# 561104
	Ly6c	APC-Cy7	BD	1:100	# 560596
	CD 45	PE-Cy7	BD	1:400	# 561868
	CD 3	V500	BD	1:100	# 560770
Antikörper-	CD 4	PB	BD	1:1000	# 558116
-Mix B	CD 8	APC H7	BD	1:100	# 560273
	CD 19	PE	BD	1:100	# 553786
	NK 1.1	FITC	BioLegend	1:100	# 108706
Live/dead	7-AAD		BioLegend	2,5:100	# 420404

Methode	Chemikalie	Firma	Bestellnummer
	Paraformaldehyd-Lösung in PBS (4%ig)	affymetrix	# J19943
Histologie	Saccharose (Succrose)	Sigma-Aldrich	# S9378
	TissueTek® O.C.T ™ Compound	Sakura	# 4583
	Methylbutan	Sigma-Aldrich	# 32631
	Aceton	vwr	# 3683.290
	Hämatoxylin nach Gill III	Merck	# 105174
	Eosin-G Lösung	Merck	#102439
	Ethanol (100%)	vwr	# 20821.296
	Ethanol (96%)	vwr	# 20905.296
	Ethanol (70%)	vwr	# 84858.290
	Xylol	vwr	# 28975.291
	Entellan® MSDS	Merck	# 107961
	In Situ cell Death Detection Kit TMR red	Sigma-Aldrich	# 11684795910
	Proteinase K, recombinant, PCR grade	Thermo Sc.	# EO0491
	Trizma [®] hydrochloride (Tris/HCL)	Sigma-Aldrich	# T5941
	Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich	# X100
	Fluoroshield™	Sigma-Aldrich	# F6182

Verwendete Kits

Kit	Firma	Bestellnummer
Hochsensitives Troponin T	Cobas	# 0592744190
Bioplex® Cell Lysis Kit	BioRad	# 171304011
Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Th17 Panel A6-Plex	BioRad	# M6000007NY

VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

Bio-Rad® Protein Assay Kit I	BioRad	# 5000001
Katecholamine im Plasma – HPLC-Kit	Chromosystems	# 5000
3-CAT-Research ELISA	LDN	# BA E-6600
Mouse SAP (Serum Amyloid P) ELISA Kit	GenWay Biotech.	# GWB-B2F5E0

Instrumente

Instrument	Firma	Bestellnummer
Hautschere	FST	# 14575-11
Feinschere	FST	# 14088-10
Splitterpinzetten	FST	# 11051-10
Delicate Suture Tying – Pinzetten	FST	#11063-07
Mikroschere	FST	# 15008-08
Nadelhalter	FST	# 12500-12
Gefäßklemme	FST	# 18055-03
Gefäßklemmen-Applikator-Pinzette	FST	# 18057-14

tMCAO-Faden

Material	Firma	Bestellnummer
6-0 medium MCAO suture L910 PK10	Doccol corporation, USA	# 6022910PK10

Nahtmaterial

Material	Firma	Bestellnummer
4/0 Perma-Hand™ Seide	Ethicon	# 683H
4/0 Perma-Hand™ Seide	Ethicon	# EH6832H
5/0 Prolene™	Ethicon	# EH7231H

Kanülen

Material	Firma	Bestellnummer
25G x 5/8, 0,05mm – 16mm) Eclipse	BD	# 305760

Venenverweilkatheter (zwecks Intubation)

Material	Firma	Bestellnummer
Vasofix® Safety 20G	Braun	# 4268113S-01

Blutröhrchen

Material	Firma	Bestellnummer
Mini Collect®	greiner bio-one	# 450537

Rasiergerät

Material	Firma	Bestellnummer
Kleintier-Rasiergerät Type 1556	Moser	# 1556-0062

Schneideblock

Material	Firma	Bestellnummer
Adult Mouse Brain Matrix, Coronal Slices	Kent Scientific	# RBMS-200

Objektträger

Material	Firma	Bestellnummer
Menzel-Gläser Superfrost-Plus	Thermo Scientific	# 4951PLUS4
Objektträger, geschliffen	Engelbrecht	# 11101

Stripetten

Material	Größe	Firma	Bestellnummer
	5 ml		# CLS4050-500EA
Costar® Stripetten	10 ml	Sigma-Aldrich	# CLS4100-500EA
	25 ml		# CLS4250-500EA

Geräte

Anwendungsgebiet	Gerätebezeichnung	Firma
Echokardiographie	Vevo2100-Echokardiographiegerät	VisualSonics,
	MS-400 Schallkopf	
Elektrokardiogramm	ECG Amplifier Type 689	Hugo Sachs
Hämatologie	Hämatologiegerät scil Vet abc Plus+	Scil Vet
Aufnahmen	Kamera + Kiron-Objektiv (105mm)	Zeiss Axiocam
	Bruker 9.4 T AVANCE III WB NMR-	Bruker
MRT	Spektrometer	Braker
	M1025 Systems (Vitalparameter)	SA Instruments

FACS	Canto II	BD
ELISA	FLUOstar Omega Mikroplatten-Lesegerät	Omega
	Electrochemical Detector CLC 100	
HPLC	Programmable Autosampler CLC 200	Chromosystems
	HPLC Pump CLC 300	
	MikroTip® Katheter (Modell SPR-1000)	Millar instruments
Millarkatheter	Druck-Volumen Transducer	
	UNO Micro Ventilator MBVC-03	UNO
Histologie	Kryomikrotom CM3050 S	Leica

Verstärkermodule

Bezeichnung	Firma
PowerLab 8/30	ADInstruments

Software

Anwendungsgebiet	Computerprogramm	Firma
Echokardiographie	VevoLab 2.2.0 VevoStrain 2.2.0	VisualSonics
Elektrokardiogramm/ Millar / Langendorff	LabChart Pro 7 iox.2	ADInstruments EMKA

HPLC	Chromsystems Easyline III analysis Software	Chromosystems
ттс	Image J	NIH
ELISA	Omega	BMG Labtech
Histologie	LAS	Leica

Mikroskope

Bezeichnung	Firma
Leica MZ 9-5	Leica
Eclipse TI-S Mikroskop	Nikon
LSM 710	Zeiss

Waagen

Waage	Firma
Feinwaage	Sartorius
Mikrowaage	Sartorius

Zentrifugen

Bezeichnung	Firma
Rotina 35R	Hettich
Mikro 200R	Hettich

3 ERGEBNISSE

3.1 Modellcharakteristika

3.1.1 Übersicht über Sterblichkeit, Biomarker und Insultgröße

Für die vorliegenden Ergebnisse wurden 197 Mäuse operiert. Davon wurde bei 109 Mäusen die tMCAO-Operation durchgeführt, die 88 verbleibenden Tiere dienten der Kontrolle.

Eine schematische Übersicht zeigt Abbildung 11 auf Seite 41 und Abbildung 12 auf Seite 42.

Mäuse der tMCAO-Gruppe hatten eine 24-stündige Überlebensrate von 94 % (n=102).

Bei 21,8 % (n=20) der tMCAO-Tiere zeigten sich hsTnT-Werte unterhalb des Referenzbereichs (14 ng/l) (n=12), bzw. die Messung konnte aufgrund technischer Fehler nicht erfolgreich durchgeführt werden (n=8).

Bei 13 % (n=11) dieser Mäuse zeigte sich eine Hirninsultgröße von <19 % und somit deutlich außerhalb der Standardabweichung (Details siehe 3.1.3.).

Zur Bildung einer möglichst homogenen Gruppe wurden zur weiteren Analyse des kardio-zirkulatorischen Phänotyps nur die Tiere in die nachfolgenden Analysen eingeschlossen, die ein hsTnT \geq 14 ng/L und eine Insultgröße \geq 19 % aufwiesen (n=71, siehe Kapitel 3.1.4.).

62,5 % der Kontrolltiere wurden zur Etablierung der Methoden verwendet. Weitere sieben Mäuse wurden bei der Bestimmung des hsTnTs aufgrund eines technischen Messfehlers von der Auswertung ausgeschlossen (vgl. *Abbildung 12, Seite 42*)



Abbildung 11 Übersicht über die Einteilung der Mäuse nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) in den verschiedenen Untersuchungen

Dargestellt ist ein Flussdiagramm aller tMCAO-Experimente mit entsprechender n-Zahl und "Drop-outs", die in die Auswertung mit einbezogen wurden.



Abbildung 12 Übersicht über die Einteilung der Kontrolltiere in den verschiedenen Untersuchungen

Dargestellt ist ein Flussdiagramm aller Kontroll-Experimente mit entsprechender n-Zahl und "Drop-outs", die in die Auswertung mit einbezogen wurden.

3.1.2 Klinische Beurteilung des Schlaganfalls

Eine Begutachtung der Tiere erfolgte zunächst direkt nach der Operation und zeigte recht variable klinische Befunde. Hierzu erfolgte die versuchsspezifische Bewertung anhand des Bederson Scores (*vgl. Tabelle 1 auf Seite 9*).

Bei allen Tieren konnte eine Vorderpfoten-Flexion festgestellt werden. Tiere erhielten einen Bederson Score von "2", sobald keine taktile Reaktion der betroffenen Körperseite zu erkennen war.

Etwa 65 % der Tiere zeigten zudem eine linksseitige Kreisbewegung und wurden einem Bederson Score von "3" zugeordnet. Die Hälfte dieser Mäuse drehte sich um ihre Längsachse und wurde mit einem Bederson Score von "3 mit Drehung" beurteilt.

24 Stunden postoperativ zeigten 90 % der Tiere eine Verbesserung der klinischen Befunde, wobei die Vorderpfoten-Flexion bei allen bestehen blieb, jedoch eine taktile Reaktion hervorgerufen werden konnte.

Eine Kreisbewegung wurde überwiegend nur noch bei Tieren, die direkt nach der Operation einen Bederson Score von "3 mit Drehung" erhielten, festgestellt.

Die Kontrolltiere zeigten keine klinisch erkennbaren Beeinträchtigungen.

3.1.3 Hirninsultgröße nach 60 Minuten transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

Die planimetrische Bestimmung der Gehirnschnitte zeigte durchschnittlich ein Insultvolumen von 30 ± 8 % bezogen auf das gesamte Hirnvolumen (*Abbildung 13*).



Abbildung 13 Eine 60-minütige transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte zu einer durchschnittlichen Insultgröße von 30 %.

Dargestellt ist die Insultgröße bezogen auf das gesamte Hirnvolumen von 102 tMCAO-operierten Mäusen. Die Auswertung erfolgte anhand Triphenyl-tetrazolium-chlorid-gefärbter Hirnschnitte mittels der Software Image J, jeweils 24 h nach rechtsseitiger Mediaokklusion.

3.2 Biomarker nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

3.2.1 Hochsensitives Troponin T

Bei 75 % der Mäuse zeigte sich nach rechtsseitiger Mediaokklusion mit einer Insultgröße von ≥19 % signifikant erhöhte Werte des kardialen hsTnTs im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren. Der vorgegebene Referenzbereich von hsTnTs lag bei ≤14 ng/l. Die Mehrheit der hsTnT-Werte befand sich im Bereich zwischen 14 bis 80 ng/l (*Abbildung 14 und Abbildung 15, Seite 45*).



Abbildung 14 Eine transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) für 60 Minuten führte nach 24 Stunden bei 75 % der Tiere zu höheren hochsensitiven Troponin T (hsTnT)-Werten.

Dargestellt sind die hsTnT-Werte von tMCAO-operierten Tieren im Vergleich zu Shamoperierten Tieren 24 Stunden nach Schlaganfallinduktion, die mittels eines Immunoassays ermittelt wurden. ERGEBNISSE



Abbildung 15 Die Mehrheit der Tiere nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zeigten 24 Stunden nach Intervention hochsensitive Troponin T (hsTnT)-Werte zwischen 14-80 ng/l.

Dargestellt ist die Verteilung der hsTnT-Werte von 94 tMCAO-operierten Mäusen. Die rote Linie markiert die Referenzgrenze von 14 ng/l.

3.2.2 Korrelationsanalyse von Insultgröße und hochsensitivem Troponin T

Interessanterweise ließ sich keine Korrelation zwischen der Größe des Hirninsults und der Konzentration des kardialen hsTnTs 24 Stunden nach tMCAO feststellen. Das Bestimmungsmaß (r²) war 0,01 (*Abbildung 16*).



Abbildung 16 Eine Korrelation zwischen hochsensitivem Troponin T (hsTnT) und der Hirninsultgröße von Mäusen nach Schlaganfall konnte nicht beobachtet werden.

Darstellung der Korrelation von hsTnT (x-Achse) und der Hirninsultgröße (y-Achse) der tMCAO-operierten Mäuse (n=102).

grün: hsTnT ≥14 ng/l, Insultgröße <19 %; n=11

rot: hsTnT ≥14 ng/l, Insultgröße ≥19 %; n=71

blau: hsTnT <14 ng/l, Insultgröße <19 %; n=8

orange: hsTnT <14 ng/l, Insultgröße ≥19 %; n=6

ERGEBNISSE

Abbildung 17 zeigt eine Vierfeldertafel zur Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit sowie positiver und negativer Vorhersagewerte für die Beteiligung der *Insula-Cortex* in Abhängigkeit von hsTnT. Der positive Vorhersagewert für eine Insulabeteiligung in Abhängigkeit von hsTnT lag bei diesen Versuchen bei 86,6 %.



Abbildung 17 Anhand der Vier-Feldertafel konnte für diese Versuche ein positiver Vorhersagewert für eine Insulabeteiligung in Abhängigkeit von hochsensitivem Troponin T (hsTnT) von 86,6 % ermittelt werden.

Zur Bestimmung der diagnostischen Genauigkeit und der positiven und negativen Vorhersagewerte, die eine Beteiligung der Insula-Cortex in Abhängigkeit vom hsTnT berechnet, wurde die hier dargestellte Vier-Feldertafel verwendet.

3.3 Systemische und lokale Entzündungsreaktionen

3.3.1 Blutuntersuchungen

Durchflusszytometrie

In diese Versuchsreihe wurden acht Tiere mit tMCAO-Behandlung und sechs Sham-Tiere eingeschlossen.

Die durchflusszytometrischen Analysen des Blutplasmas 24 Stunden postoperativ ergaben eine signifikant größere Anzahl an Granulozyten pro μ l Blut in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (462 ± 111 Granulozyten/ μ l vs. 327 ± 76 Granulozyten/ μ l, tMCAO vs. Sham; *p*=0.0264). Daraus ergab sich eine Differenz von 135 Granulozyten/ μ l.

Des Weiteren wurde eine tendenziell erhöhte Anzahl der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet.

Die Anzahl der Monozyten war zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden (Abbildung 18).



Abbildung 18 Die transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte 24 Stunden nach Intervention zu einer höheren Granulozytenanzahl im Blutplasma von Tieren nach Schlaganfall im Vergleich zu Sham-operierten Tieren.

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der myeloiden Zellen (Monozyten, Ly6c⁻-Monozyten (Mo Ly6c⁻), Ly6c⁺-Monozyten (Mo Ly6c⁺), natürliche Killerzellen (NK) und Granulozyten) im Blut von tMCAO- und Sham-operierten Tieren.

Bei der Untersuchung der lymphatischen Zellen zeigte sich eine signifikant kleinere Anzahl an B-Lymphozyten bei tMCAO-operierten im Vergleich zu Sham-operierten Mäusen (142 ± 50 Leukozyten/µl vs. 267 ± 92 Leukozyten/µl, tMCAO vs. Sham; p=0.0067).

Ein signifikanter Unterschied der T-Lymphozyten zwischen den beiden Gruppen wurde nicht beobachtet (*Abbildung 19*).



Abbildung 19 Die transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte zu weniger zirkulierenden B-Lymphozyten verglichen zu Sham-operierten Mäusen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrische Analyse von lymphozytären Zellen (B- und T-Lymphozyten) im Blut von Sham- und tMCAO-operierten Tieren nach 24 Stunden.

"BioPlex Assay" (Zytokine)

Hinsichtlich möglicher inflammatorischer Prozesse wurden Untersuchungen von Zytokinen in Blut und Herzgewebe durchgeführt.

Hierbei konnte im Blutplasma von tMCAO-operierten Mäusen (n=8) eine signifikant höhere Konzentration von IL-6 im Vergleich zur Sham-Gruppe (n=7) beobachtet werden (23,76 \pm 10,94 pg/ml vs. 9,31 \pm 7,20 pg/ml, tMCAO vs. Sham) (*Abbildung 20*).



Abbildung 20 Im Blutplasma von Schlaganfall-operierten Tieren konnte im Vergleich zu Shamoperierten Tieren 24 Stunden nach Intervention eine signifikant höhere Konzentration von Interleukin-6 (IL-6) festgestellt werden.

ERGEBNISSE

Dargestellt sind die Ergebnisse von IL-6 der Plasmaanalyse von Sham- und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO). Die Untersuchung wurde mit einem "BioPlex-Assay" durchgeführt.

Hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede von zirkulierenden IL-1ß, -10 und TNFα zwischen den Gruppen festgestellt *(Abbildung 21).*



Abbildung 21 Im Gruppenvergleich zeigten sich 24 Stunden nach Intervention keine Unterschiede von Interleukin (IL)-1β-, -10- und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα)-Konzentrationen zwischen Sham- und Schlaganfall-Tieren.

Dargestellt sind die Ergebnisse von zirkulierenden IL-1ß (A), IL-10 (B) und TNFα (C) von Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO). Die Untersuchungen wurden mit einem "BioPlex-Assay" durchgeführt.

Serumamyloid P (SAP)

Die Bestimmung des SAPs im Plasma zeigte signifikant höhere Konzentrationen in der tMCAO-Gruppe verglichen zur Sham-Gruppe ($395,0 \pm 185,8 \mu g/ml$ vs. $148,2 \pm 171,5 \mu g/ml$ tMCAO vs. Sham; *p*=0,0015) (*Abbildung 22, Seite 50*).

ERGEBNISSE



Abbildung 22 Im Vergleich zu Sham-Tieren wurden bei Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) höhere Werte von Serumamyloid P (SAP) gemessen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der ELISA-Bestimmung von zirkulierendem SAP in Sham- und tMCAO-operierten Tieren nach 24 Stunden.

3.3.2 Untersuchungen der Milz

Die Untersuchungen der myeloiden Zellen in der Milz der Tiere mittels Durchflusszytometrie zeigten bei den Granulozyten um durchschnittlich 50 % höhere Werte in der tMCAO-Gruppe als in der Sham-Gruppe (1131 ± 452 Leukozyten/µl vs. 559 ± 348 Leukozyten/µl, tMCAO vs. Sham; p=0,0287). Die Monozyten und NK-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (*Abbildung 23*).



Abbildung 23 In der Milz wurden 24 Stunden nach Intervention höhere Granulozyten-Konzentrationen in Tieren nach Schlaganfall im Vergleich zu Sham-operierten Tieren gemessen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der myeloiden Zellen (Monozyten, Ly6c⁻-Monozyten (Mo Ly6c⁻), Ly6c⁺-Monozyten (Mo Ly6c⁺), natürliche Killerzellen (NK) und Granulozyten) in der Milz von Sham-operierten Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).

Ergebnisse der lymphatischen Zellen zeigten eine signifikant niedrigere T-Lymphozytenkonzentration im Gruppenvergleich. Die Sham-Tiere hatten in einem μ l Milzfiltrat 2560 ± 446 Zellen und die tMCAO-Tiere 1856 ± 322 Zellen.

Ein Unterschied in der Anzahl von B-Lymphozyten konnte zwischen den Gruppen nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 24).



Abbildung 24 In der Milz führte die Schlaganfall-Operation im Gegensatz zur Sham-Operation nach 24 Stunden zu einer niedrigeren T-Lymphozytenkonzentration.

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von lymphatischen Zellen in der Milz von Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).

3.3.3 Untersuchungen herzständiger Zellen

Leukozyten

Die durchflusszytometrische Analyse herzständiger Zellen nach vorhergehendem Herzverdau wurde bei acht tMCAO-Tieren und sechs Sham-Tieren durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Granulozytenanzahl pro Milligramm Herzgewicht bei tMCAO-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren beobachtet (9,5 ± 6,6 Granulozyten/mg vs. 3,5 ± 3,4 Granulozyten/mg, tMCAO vs. Sham; p=0,0363) (*Abbildung 25, Seite 52*).



Abbildung 25 24 Stunden nach Intervention wurde in Schlaganfall-operierten Tieren eine höhere Anzahl an Granulozyten im Herzgewebe gefunden als in Sham-operierten Tieren.

Dargestellt sind die Anzahl herzständiger Granulozyten in einem Milligramm Herzgewebe nach enzymatischem Herzgewebeaufschluss und durchflusszytometrischer Analyse von Sham-operierten Tieren und von Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).

Weiter konnten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der Monozyten zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Die Lymphozyten wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei tMCAO-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren auf.

Zytokin-Analyse im Herzgewebe

Im Herzgewebe zeigte sich ein Trend zu höheren Werten von IL-1β und IL-6 bei tMCAO-operierten Tieren im Vergleich zu Sham-operierten Tieren. In beiden Fällen stiegen die jeweiligen Zytokine in der tMCAO-Gruppe um den Faktor zwei an *(Abbildung 26).*

Bei IL-10 und TNFα wurde ein Trend zur Erhöhung in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe festgestellt. (*Abbildung 27*).



Abbildung 26 Im Herzgewebe von Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zeigten sich Tendenzen von höheren Interleukin (IL)-1β und -6-Konzentrationen im Vergleich zu Sham-operierten Tieren.

Dargestellt sind die Ergebnisse der BioPlex-Versuche von Interleukine (IL)-1ß (A) und -6 (B) im Myokardgewebe von Sham-Tieren und Tieren nach tMCAO 24 Stunden nach Intervention.



Abbildung 27 Im Vergleich zwischen der Schlaganfall- (tMCAO) und Sham-Gruppe zeigten sich im Herzgewebe 24 Stunden nach Intervention keine Unterschiede von Interleukin (IL)-10 und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα).

Dargestellt sind die Ergebnisse der BioPlex-Untersuchung von herzständigen IL-10 (A) und $TNF\alpha$ (B).

3.4 Katecholamine

Um einen möglichen Einfluss der Katecholamine beurteilen zu können, wurde in folgender Versuchsreihe sieben tMCAO- und neun Sham-Tiere eingeschlossen, deren Blutplasma mittels eines ELISAs auf Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin untersucht wurde.

Bei der Untersuchung zeigten sich im Gruppenvergleich tendenzielle Unterschiede bei der Plasmakonzentration an Adrenalin. Die Sham-Gruppe wies eine Konzentration von 1000 ng/l auf. Die Werte der tMCAO-Gruppe waren um 1200 ng/l höher (2200 ng/l). Noradrenalin und Dopamin hingegen wiesen keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf (*Abbildung 28*).

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Messungen mit der HPLC: hier konnten ebenfalls tendenziell höhere Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentrationen in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden.



Abbildung 28 Bei Schlaganfall-operierten Tieren konnte im Vergleich zu Sham-operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention tendenziell höhere Adrenalinkonzentrationen festgestellt werden.

> Dargestellt sind die Ergebnisse des Katecholamin-ELISAs im Plasma (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin) von Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).

3.5 Hämodynamik

3.5.1 Aortale Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung in der Aorta wurde bei 20 tMCAO-operierten und neun Sham-operierten Tieren durchgeführt. Das Narkoseregime war in allen Fällen gleich.

Wie *Abbildung 29* zeigt, wurden signifikant niedrigere Werte des systolischen Blutdrucks in den tMCAO-Tieren im Vergleich zu Sham-Tieren beobachtet ($85,79 \pm 7,23$ mmHg vs. 98,67 ± 8,38 mmHg, tMCAO vs. Sham; *p*=0,0002) (A). Dies galt auch für den diastolischen Druck ($68,33 \pm 10,30$ mmHg vs. 52,60 ± 10,12 mmHg, tMCAO vs. Sham; *p*=0,0007) (B), sodass hieraus insgesamt signifikant kleinere MAP-Werte in tMCAO-Tieren verglichen zu Sham-Tieren resultierten ($84,89 \pm 6,74$ mmHg vs. 69,15 ± 8,34 mmHg, tMCAO vs. Sham; *p*<0,0001) (C). Da zudem das Herzzeitvolumen in tMCAO-Tieren signifikant kleinere Werte im Vergleich zu Sham-Tieren zeigte, war der TPR in der tMCAO-Gruppe mit 8,1 ± 1,3 $\frac{\text{mmHg}}{\text{ml/min}}$ um 3,3 $\frac{\text{mmHg}}{\text{ml/min}}$ höher als in der Sham-Gruppe ($5,8 \pm 1,3 \frac{\text{mmHg}}{\text{ml/min}}$) (D).



Abbildung 29 Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Vergleich zu Sham-operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention niedrigere Blutdruckwerte.

Hier ist jeweils im Gruppenvergleich zwischen Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) der A) systolische und der B) diastolische Druck

gemessen in der Aorta dargestellt. Hieraus wurde der mittlere arterielle Druck (MAP) (C) errechnet. D) Totaler peripherer Widerstand (TPR), resultierend aus MAP und Herzzeitvolumen.

3.5.2 Druck- Volumenmessungen im linken Ventrikel

Im direkten Anschluss an die aortale Blutdruckmessung zeigte die Druck-Volumenmessungen im linken Ventrikel in der tMCAO-Gruppe signifikant kleinere endsystolische Druckwerte (LVESP) im Vergleich zur Sham-Gruppe (84,6 ± 9,9 mmHg vs. 96,0 ± 6,1 mmHg, tMCAO vs. Sham; p=0,0127). Der enddiastolische Druck zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (*Abbildung 30*).

Anhand dieser Messungen konnte ebenso gezeigt werden, dass der maximale Druckanstieg pro Sekunde (dP/dt max) in der Systole bei tMCAO-Tieren signifikant kleiner war als in der Sham-Gruppe (5869 ± 1825 mmHg/s vs. 8280 ± 1454 mmHg/s, tMCAO vs. Sham; p=0,0289) (*Abbildung 31 A, Seite 57*).

In der Diastole zeigte der maximale Druckabfall keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (*Abbildung 31 B, Seite 57*).



Abbildung 30 Die Druckmessung im linken Ventrikel zeigte 24 Stunden nach Intervention bei Tieren nach transienter Okklusion (tMCAO) der mittleren Hirnarterie in der Systole signifikant kleinere Werte als bei Sham-Tieren.

A) Hier ist der linksventrikuläre endsys- (LVESP) und der B) enddiastolische Druck (LVEDP) von Sham-Tieren und Tieren nach tMCAO dargestellt.



Abbildung 31 Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Gegensatz zu Sham-operierten Tieren in der systolischen Druckentwicklung 24 Stunden nach Intervention signifikant kleinere Werte.

Dargestellt ist die Steigung des Drucks pro Sekunde in der A) Systole (dP/dt _{max}) und B) Diastole (dP/dt _{min}) von Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO). Die Messungen wurden mittels Millarkatheter-Systems im linken Ventrikel durchgeführt.

3.6 Linksventrikuläre Herzfunktion nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

Zur Bestimmung weiterer kardialer Funktionsparameter wurden präoperativ und 24 Stunden postoperativ nach tMCAO- und Sham-Operation echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. In den Auswertungen wurden nur Mäuse berücksichtigt, die den vorherigen Einsschlusskriterien entsprochen hatten (hsTnT \geq 14 ng/L und Insultgröße \geq 19 %). Die tMCAO-Gruppe zeigte hierbei signifikant weniger Auswurfleistung (EF) im Vergleich zur Sham-Gruppe (45,4 ± 0,6 % vs. 60,4 ± 0,4 %, tMCAO vs. Sham; *p*<0,0001). Das Herzzeitvolumens zeigte durchschnittlich um 10 ml/min kleinere Werte in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (10,1 ± 2,4 ml/min vs. 21,5 ± 5,2 ml/min, tMCAO vs. Sham; *p*<0,0001) (*vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33, Seite 59*).



Abbildung 32 Die Schlaganfall-Operation führte im Vergleich zur Sham-Operation 24 Stunden nach Intervention zu signifikant kleineren Werten in der Auswurfsleistung.

A) Dargestellt ist die echokardiographisch bestimmte Auswurfleistung (EF), die aus dem B) enddiastolischen (EDV) und C) endsytolischen Volumen (ESV) kalkuliert wurde, von Shamoperierten Tieren sowie Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).



Abbildung 33 Schlaganfall-operierte Tiere zeigten signifikant kleinere Herzzeitvolumen (HZV)-Werte als Sham-operierte Tiere.

A) Dargestellt sind die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen A) des HZVs, resultierend aus B) der Herzfrequenz (HF) und C) dem Schlagvolumen (SV) von Shamoperierten Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) nach 24 Stunden. Die Kontraktilität, gemessen hier im "Fractional Shortening", wies auch signifikant kleinere Werte von 16,6 ± 5,2 % in der tMCAO-Gruppe gegen 25,9 ± 9,2 % in der Sham-Gruppe auf (p<0,0001) (*Abbildung 34*).



Abbildung 34 Die Werte des Herzfunktionparameters "Fractional Shortening" (FS) waren bei Schlaganfall-Tieren signifikant kleiner als bei Sham-Tieren.

Dargestellt sind die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen nach 24 Stunden der fraktionellen Verkürzung (FS) von Sham-Mäusen und Mäusen nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO).

Mit Hilfe der Strainanalyse ließ sich eine zusätzliche Aussage über eine verminderte longitudinale Deformierbarkeit (GLS) der Ventrikel treffen: die GLS zeigte signifikant größere Werte in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (-12,1 ± 2,9 % vs. -16,0 ± 3,8 %, tMCAO vs. Sham; p=0,0013) (*Abbildung 35*).



Abbildung 35 Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Vergleich zu Sham-Tleren 24 Stunden nach Intervention signifikant größere Werte bei der Messung des globalen longitudinalen Strains (GLS).

Als Erweiterung der echokardiographischen Untersuchung wurde hier mittels Strainanalyse der GLS von Sham-operierten Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) bestimmt.

Die Berechnung der Strain Rate (SRe) zeigte eine verminderte Amplitudenhöhe der E-Welle mit einer verminderten Steigung in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe $(3,2 \pm 0,9 (1/s) \text{ vs. } 5,0 \pm 1,6 (1/s), \text{tMCAO vs. Sham}; p=0,0075)$ (Abbildung 36).



Abbildung 36 Die Strainrate (SRe)-Werte waren bei Tieren nach Schlaganfall im Gegensatz zu Sham-Tieren 24 Stunden nach Intervention signifikant kleiner.

Mittels Strainanalyse wurde die SRe von Sham-Tieren und Tiere nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)-Tieren bestimmt.

3.7 Elektrokardiogramm (EKG)- Analyse

Aufzeichnungen des EKGs zeigten unmittelbar vor Beginn der Operation eine Herzfrequenz von durchschnittlich 500 Schlägen pro Minute. Innerhalb der ersten 15 Minuten stieg in beiden Gruppen der Wert um 18-47 Schläge pro Minute an.

Nach einer Stunde sank die Herzfrequenz der tMCAO-operierten Mäuse um etwa 50 Schläge pro Minute auf durchschnittlich 450 Schläge pro Minute. Im Gegensatz hierzu wiesen Sham-operierte Mäuse wieder eine mittlere Frequenz von etwa 500 Schlägen pro Minute auf.

24 Stunden postoperativ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen: die Interventionsgruppe zeigte eine herabgesetzte Herzfrequenz von etwa 385 ± 43 Schlägen pro Minute, hingegen wies die Kontrollgruppe eine Frequenz von 522 ± 65 Schlägen pro Minute auf (*Abbildung 37 A, Seite 62*).

Auswertungen der Herzfrequenzvariabilität zeigten in der tMCAO-Gruppe eine signifikant größere Variabilität der Abstände zwischen den R-Zacken nach 24 Stunden im Vergleich zur

Sham-Gruppe (157 ± 17 vs. 116 ± 15 ms ms, tMCAO vs, Sham; *p*=0,0075) (*Abbildung 37 B*)

Weiter wurden tendenziell größere Werte im "low frequency band" (LF) (*Abbildung 38 A*) nach 24 Stunden bei Tieren nach der tMCAO-Operation im Vergleich zu Tieren nach der Sham-Operation festgestellt (66,1 ± 20,8 Hz vs. 29,4 ± 23,1 Hz, tMCAO vs. Sham). Hingegen zeigten sich tendenziell kleinere Werte im "high frequency band" (HF) nach 24 Stunden in der tMCAO-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe (33,8 ± 20,8 Hz vs. 70,2 ± 22,7 Hz, tMCAO vs. Sham) (*vgl. Abbildung 38 B*).



Abbildung 37 24 Stunden nach Intervention zeigten Untersuchungen des Herzrhythmus kleinere Herzfrequenzwerte und eine höhere Herzfrequenzvariabilität bei Schlaganfall-Tieren als bei Sham-Tieren.

A) Herzfrequenzen (HF) der Sham-Gruppe und der Tiere nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zu unterschiedlichen Zeitpunkten





Abbildung 38 Herzfrequenzvariabilitätsmessung im "low- (LF)" und "high frequency band (HF)" zeigten nach 24 Stunden tendenzielle Unterschiede zwischen Schlaganfall- und Sham-Tieren.

Dargestellt sind A) das LF und B) das HF der Sham-Tieren und Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zu verschiedenen Zeitpunkten.
Der R-/S-Quotient zeigte bei tMCAO-operierten Mäusen mit einer Erhöhung des hsTnT (>14 ng/l) keinen Unterschied zu Sham-operierten Mäusen.

3.8 Myokardiale Texturanalyse

3.8.1 Magnetresonanztomographie

Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie wurden die Ergebnisse der Echokardiographie, das heißt eine Verminderung des Herzzeitvolumens, des Schlagvolumens, sowie des endsystolischen und enddiastolischen Volumens in der tMCAO-Gruppe, bestätigt. Zudem wurde 24 Stunden postoperativ eine diffus verteilte T1-Zeit-Erhöhung um etwa 180 Millisekunden bei Tieren mit tMCAO im Vergleich zu den basal gemessenen Werten gemessen (1184 ± 128 ms vs. 1007 ± 90 ms, tMCAO vs. Baseline; p=0,047) (siehe Abbildung 39). Die T2-Zeit bei den tMCAO-Tieren war hingegen um 1,7 Sekunden vermindert (18,1 ± 1,5 ms vs. 19,8 ± 0,5 ms, tMCAO vs. Baseline; p=0,072) (siehe Abbildung 40, Seite 64).



Abbildung 39 Magnetresonanztomographische (MRT)-Messungen 24 Stunden nach Schlaganfall zeigten verlängerten T1-Relaxationszeiten.

ERGEBNISSE

A) Kernspintomographisch bestimmte T1-Relaxationszeiten vor transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) (Baseline) und 24 Stunden nach tMCAO-Operation

B) Diese Abbildung zeigt repräsentative MRT-Bilder (T1 Mapping) eines Mäuseherzen vor und 24 Stunden nach tMCAO.



Abbildung 40 Schlaganfall-operierte Tiere wiesen verkürzte T2-Relaxationszeiten auf.

Hier sind die kernspintomographischen Untersuchungsergebnisse zu T2-Relaxationszeiten von Tieren vor und 24 Stunden nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) dargestellt.

3.8.2 Histologische Untersuchungen

Bei den jeweiligen Färbungen wurden Gefrierschnitte des Myokards von neun tMCAOoperierten und sieben Sham-operierten Tieren ausgewertet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Untersuchung der HE-gefärbten Gefrierschnitte wurden keine signifikanten Unterschiede der Gewebestrukturen zwischen der tMCAO- und der Sham-Gruppe ersichtlich.

TTC Färbung

Die TTC-Färbung des Myokardgewebes zeigte sowohl bei tMCAO- als auch bei Sham-Tieren keine avitale TTC-Bereiche.

Apoptotische Zellprozesse

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Herzen 24 Stunden postoperativ zeigten eine signifikant höhere Anzahl an DAPI- und TUNEL-positiven Zellen nach tMCAO im Vergleich zu Sham (18,1 ± 8,0 Zellen/Herz vs. 2,1 ± 1,3 Zellen/Herz, tMCAO vs. Sham; p=0,002) (vgl. Abbildung 41 und Abbildung 42).



Abbildung 41 Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Vergleich zu Sham-Tieren nach 24 Stunden eine höhere Anzahl an DAPI- und TUNEL-positiven Zellen im Herzgewebe.





Abbildung 42 Repräsentative Aufnahmen der Apoptose-Färbung von Herzen von Sham- und Schlaganfall-operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der TUNEL-Färbung von einem Mäuseherz nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) (unten) und einem Herzen nach Sham-OP (oben). DAPI (blau): vitale Zellen, leuchtend rot: TUNEL positive Zellen.

4 DISKUSSION

4.1 Kernaussagen

Zusammengefasst konnten 24 Stunden nach tMCAO folgende Befunde erhoben werden, die im Folgenden diskutiert werden:

- tMCAO führte bei 75 % der Mäuse zu einem vierfachen Anstieg des kardialen hsTnT im Plasma, wobei die ausgeschüttete Menge unabhängig von der Größe des Hirninsults war. Jedoch sagte erhöhtes hsTnT mit einer Wahrscheinlichkeit von 86,6 % (PPV) eine Insulabeteiligung vorher.
- 2. Es konnte eine Bradykardie und eine Veränderung der Herzfrequenzvariabilität sowie eine Verschlechterung der systolischen und diastolischen Herzfunktion festgestellt werden.
- 3. Im Myokardgewebe tMCAO-operierter Tiere konnte keine Nekrose, jedoch vermehrt apoptotische Zellprozesse und eine Verbreiterung des extrazellulären Raums gezeigt werden.
- 4. tMCAO rief eine systemische und myokardiale proinflammatorische Reaktion am Herzen hervor.

4.2 Klinische Relevanz und Variabilität des Modells

Die postoperative Belastung durch die Anwendung des tMCAO-Modells von *Koizumi* (1986) modifiziert nach *Longa et al.* ⁶³ übertragen auf die Maus durch *Kamii* ⁶⁴ und *Lo* ⁶⁵ entspricht einem mittelgradig schweren operativen Eingriff. Diese Methode ähnelt auf Grund der Möglichkeit einer Reperfusion - im Gegensatz zur permanenten elektromechanischen Ligatur ⁶⁶ und zur Photothrombose mittels Bengalrosa ⁶⁷ - humanen Schlaganfallereignissen und hat somit mildere Auswirkungen zur Folge.

Die Zeitspanne von 60 Minuten Okklusion erwies sich als unumgänglich, um mit hoher Wahrscheinlichkeit einen ausreichend großen Infarktbereich mit Beteiligung des Thalamus, Hypothalamus und des Cortex, hier insbesondere des *Insula-Cortex*, zu erzielen.⁶⁸ Tiere mit einem Infarktbereich <19 % zeigten überwiegend eine rein subkortikale Infarktlokalisation, insbesondere keine Beteiligung des *Insula-Cortex* und nur selten einen hsTnT-Anstieg. Die Insultgröße von durchschnittlich 30 % bezogen auf beide Großhirnhemisphären zeigte mit einer Standardabweichung von ±8,1 % eine relativ hohe Variabilität, die sich ebenfalls in der klinischen Symptomatik der Tiere (wie Kreisbewegung oder Drehungen um die Längsachse) widerspiegelte. Diese Abweichung wurde bereits durch *Clark et al.*⁵¹ beschrieben. In diesem Zusammenhang spielte die intraindividuelle Kollateralversorgung der Hirngefäße von

Mäusen eine große Rolle, die nachweislich vorwiegend durch die *Aa. vertebrales* sichergestellt wird und kompensatorisch zu milderen Auswirkungen führen sollte.⁶⁹

Durch empirische Erkenntnisse in der Humanmedizin ist bekannt, dass ein Schlaganfall ohne Schmerzen einhergeht, sodass die analgetische Abdeckung der Mäuse zur Linderung des Wundschmerzes diente. Die Auswirkung der Schlaganfallinduktion hatte in den vorliegenden Versuchen dennoch einen starken Einfluss auf den Allgemeinzustand, verursacht durch eine deutliche Mobilitätseinschränkung und ein reduziertes Trink- und Fressverhalten. Bei den vorliegenden Versuchen handelte es sich ausschließlich um Akutversuche mit einer Maximaldauer von 24 Stunden. Erstaunlicherweise zeigten die Tiere eine sehr schnelle Kompensations- und spontane Erholungsfähigkeit innerhalb dieses kurzen Zeitraums. Trotz des massiven Eingriffs waren die Tiere gut lebensfähig.

4.3 Auswirkungen der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten typisch humanmedizinische Befunde nach einem akuten Schlaganfall, die nachfolgend strukturiert aufgeführt und diskutiert werden.

4.3.1 Troponinausschüttung nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

Der Großteil der tMCAO-operierten Mäuse zeigte einen erhöhten Nachweis von hsTnT im Blutplasma.

Die Bestimmung von hsTnT im Plasma zeigte bei etwa 75 % der tMCAO-operierten Tiere eine Erhöhung auf durchschnittlich 40 ng/l. In der Literatur wurde dieses Phänomen bereits nach humanen Schlaganfallereignissen ohne Beteiligung von Koronargefäßerkrankungen beschrieben.^{4, 6} Der Mechanismus hierzu wurde allerdings bislang nicht ausreichend erklärt. In einer großen klinischen Studie, wie auch in der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass hierbei keine Korrelation zwischen der Größe des Hirninfarkts und der Menge an Troponin T bestand.¹⁸ In der Studie von *van der Bilt et al.* wurde aber eine eindeutige Korrelation zwischen einer Troponinausschüttung und der Lokalisation im Bereich der rechten *Insula-Cortex* anterior beschrieben.¹⁸

In unserem Modell konnten wir ebenfalls zeigen, dass eine Beteiligung der *Insula-Cortex* zu einer Erhöhung von kardialem hsTnT mit einem positiven Vorhersagewert von 86,6 % führte.

4.3.2 Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf die kardiale Funktion

In der Literatur konnte bisweilen experimentell belegt werden, dass eine permanente Okklusion der rechten mittleren Hirnarterie (pMCAO) bei Mäusen unter Insulabeteiligung zu einer Verschlechterung des kardialen Kontraktionsvermögens führt.⁷⁰ *Bieber et al.* beobachtete nach 30-minütiger transienter Okklusion sowohl der rechten als auch linken Media (tMCAO) eine Herzinsuffizienz mit Tachykardie, die unter der Gabe von Betablockern nicht auftrat.⁷¹

Besonders einflussnehmende Größen in der Echokardiographie sind die Wahl des Narkotikums und die Körpertemperatur.⁷² In allen Versuchen wurde darauf geachtet, dass die Dosierung und Applikationsart der Anästhetika und Durchführungsdauer in der Interventions- und Kontrollgruppe gleich gehalten wurden. Die Körpertemperatur wurde während der Untersuchungen mit Hilfe einer Wärmeplatte konstant bei 37 °C gehalten. Die in unseren Versuchen durchgeführte transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie führte zu einer reproduzierbaren, vordergründig systolischen, aber auch diastolischen Dysfunktion. Gleichzeitig zeigte die Analyse der R-/S-Segmente, dass sich bei tMCAO-operierten Tieren keine relative koronare Insuffizienz mit nachfolgender Ischämie beobachten ließ.

Ein möglicher respiratorischer Einfluss, der unter anderem durch eine Sauerstoffunterversorgung oder einer Störung des Säure-Basen-Haushalts zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führen könnte, wurden in den vorliegenden Versuchen bislang nicht untersucht.

4.3.3 Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf den Herzrhythmus

Elektrophysiologische Veränderungen nach einem Schlaganfallereignis werden häufig beobachtet und werden kontrovers diskutiert. ^{29, 73}

Im Gegensatz zu bereits veröffentlichen Daten, die in der oben bereits erwähnten Langzeitstudie eine Tachykardie nach AIS beobachten konnten ⁷¹, zeigte unsere Studie eine Bradykardie in der akuten Phase nach AIS. Bereits eine Stunde aber auch 24 Stunden nach Mediaokklusion zeigte sich eine Abnahme der Herzfrequenz. Zudem zeigten diese Tiere nach 24 Stunden eine höhere Herzfrequenzvariabilität.

Als Ursachen der Bradykardie konnten zunächst Erregungsleitungsstörungen wie Vorhofflimmern und atrioventrikulärer Block anhand der EKG-Aufzeichnungen ausgeschlossen werden. Auch der Einfluss des Narkotikums (1,5 Vol.-% Isofluran) konnte auf Grund der Kontrolltiere, die die gleiche Behandlung erfahren haben und keine Abweichungen der Herzfrequenz aufwiesen, als Ursache ausgeschlossen werden. Eine mögliche Auswirkung der reduzierten Mobilität und eines schlechten Oberflächen-/ Volumen-Verhältnisses der Tiere ist eine Hypothermie, die zu einem Abfall der Herzfrequenz führen kann. Diese wurde intraoperativ und während der Echokardiographie durch Wärmeplatten, als auch zunächst postoperativ durch eine Wärmelampe weitgehend unterbunden.

Eine weitere Einflussgröße besteht durch das vegetative Nervensystem, welches unter einer vermehrt parasympathischen Wirkung eine Bradykardie und eine indirekte Vasodilatation durch Hemmung des Sympathikus hervorruft. Die Innervation der Vorhöfe erfolgt direkt durch den *N. vagus*, der mit seinen überwiegend parasympathischen Fasern für die Erniedrigung der Herzfrequenz verantwortlich ist. Ebenfalls stellt eine direkte baroreflektorische Wirkung des Parasympathikus eine mögliche Ursache dar.⁷⁴ Hierbei würden die parasympathisch innervierten Barorezeptoren im Carotissinus und im Aortenbogen stimuliert werden und könnten in Folge dessen zu einer Senkung der Herzfrequenz führen. Bei den vorliegenden Versuchen zeigten die Sham-Tiere jedoch, dass sowohl die Manipulation im Operationsbereich (Lokalität des *N. vagus*) als auch die Ligatur der Carotiden keinen Einfluss auf die Herzfrequenz hatten.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Bradykardie nach Mediaokklusion stellt der ischämisch bedingte Ausfall der rechten Insula-Cortex dar, die als sympathisches Aktivitätszentrum beschrieben wird.⁷⁵ Durch den Wegfall der sympathischen Aktivierung überwiegt das parasympathische Zentrum in der linken Insula-Cortex.⁷⁶ Lubjuhn et al. zeigte dass Mäuse nach einer linksseitigen permanenten Mediaokklusion eine hierzu. herabgesetzte Herzfrequenz und eine Erhöhung der Herzfrequenzvariabilität aufwiesen, die auf ein sympathisch-parasympathisches Ungleichgewicht zurückzuführen sein könnte.⁷⁷ Im Menschen konnte hierzu bereits gezeigt werden, dass in der Akutphase ein ischämischer Insult der rechten Insula-Cortex ein parasympathisches Ungleichgewicht zugunsten der linken Insula bewirkt und sich in Form von einer Bradykardie und eines AV-Blocks äußert.⁷⁶ Ergebnisse der Herzfrequenzvariabilitätsmessung im "low frequency band" zeigten jedoch einen paradoxen Effekt. Hier zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der sympathischen Aktivität 24 Stunden nach Mediaokklusion. Dieses Phänomen, sowie eine nicht eindeutige Interpretation der HRV-Ergebnisse werden in der Literatur kontrovers beschrieben und diskutiert.⁷⁸ Hierzu erschienen die Ergebnisse besonders relevant, da die Spezies Maus vorwiegend einem "sympathikotonen Typ" zugeordnet wird, was bedeutet, dass die Maus aufgrund ihrer niedrigen Stresstoleranz gegenüber äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel dem "Handling" mit einer Aktivitätssteigerung des Sympathikus reagiert.⁷⁹

All diese Beobachtungen sind von wichtiger Bedeutung, da eine Abnahme der Herzfrequenzvariabilität im Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität bei Herzerkrankungen steht.⁷⁸

4.3.3.1 Einfluss der Neurotransmitter auf die kardiovaskuläre Funktion nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

Bisweilen wird die *Insula-Cortex* als mögliches sympathisches und parasympathisches Aktivitätszentrum und als möglicher Ursprung der vegetativen Dysregulation in Betracht gezogen.

Eine reduzierte Auswurfleistung (EF) nicht ischämischer Genese, stellt eine häufige Beobachtung bei Schlaganfallpatienten dar.⁶ Ein ähnlicher Phänotyp ist im Zusammenhang mit der Tako-Tsubo-Kardiomyopathie bekannt. Es wird angenommen, dass es in Folge von physischem und emotionalem Stress und damit einhergehender erhöhter Ausschüttung von Katecholaminen zu EKG- und Wandbewegungsveränderungen kommt (MINOCA).^{80, 81}

Ebenfalls konnte in der bereits erwähnten Langzeituntersuchung nach transienter Mediaokklusion eine kardiale Funktionsbeeinträchtigung dargestellt werden, die durch eine chronische Sympathikus-Stimulation mit erhöhter Ausschüttung von Katecholaminen und Tachykardie charakterisiert war.⁷¹ Entgegengesetzt zu diesen Ergebnissen nahmen die Katecholamine in den Akutversuchen im Hinblick auf die Bradykardie und das reduzierte Schlagvolumen eine untergeordnete Stellung ein. In der vorliegenden Arbeit konnten wir keine signifikante Erhöhung der Katecholamine im Plasma zeigen. Weiter gilt zu beachten, dass die eigenen Ergebnisse eine relativ hohe Standardabweichung aufwiesen, was möglicherweise durch die geringe Stresstoleranz von Mäusen begründet sein könnte.

So liegt an dieser Stelle der Schluss nahe, dass es sich bei dem beobachteten Phänotyp um eine direkte parasympathische Überaktivität handelt und aufgrund dessen wahrscheinlich keine Erhöhung systemischer Transmitter gemessen werden konnte.

4.3.4 Effekte der transienten Okklusion der mittleren Hirnarterie auf die Hämodynamik

In der akuten Phase nach einem Schlaganfallereignis steigt der arterielle Blutdruck an und normalisiert sich innerhalb weniger Tage wieder. In der Literatur wird dies als ein endogen bedingter Kompensationsmechanismus zur Verbesserung der zerebralen Durchblutung beschrieben.⁸²

In unseren Versuchen war in der Peripherie ein Abfall des Blutdrucks zu beobachten. Bedingt durch die Berechnung *(siehe Formel 6, Seite 10)* führte dies zusammen mit der Verschlechterung des Herzzeitvolumens zu einem Anstieg des totalen peripheren Widerstands.

24 Stunden nach tMCAO zeigten intrakardiale Messungen eine Kontraktionsverschlechterung, die mit einem erniedrigten Kontraktionsmaximum und einer Verlängerung des Druckaufbaus im linken Ventrikel einhergingen *(siehe Abbildung 40, Seite 71).*

Diese Ergebnisse bestätigten die echokardiographischen Befunde.



Abbildung 40Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Druckverlaufs im linken Ventrikel 24
Stunden nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)- und Sham-Operation.

Die Steuerung der Hämodynamik obliegt im Allgemeinen dem vegetativen Nervensystem sowie dem endokrinen System. Wie bereits bei der Bradykardie, könnte hier ebenfalls die Hemmung des Sympathikus das Ausbleiben der zu erwartenden Kompensation erklären. Eine nähere Untersuchung des endokrinen Systems wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt.

Einen weiteren einflussnehmenden Aspekt im hämodynamischen Geschehen stellt die blutdrucksenkende Wirkung von Opioiden dar. In unseren Versuchen wurde beiden Versuchsgruppen vor der jeweiligen Intervention Buprenorphin verabreicht. Die Kontrolltiere zeigten hierbei im Gruppenvergleich zu tMCAO-Tieren signifikant größere Werte in der Hämodynamik, sodass ein Einfluss des Medikaments ausgeschlossen wurde.

Vergleichbar zu diesen Ergebnissen konnte in einem Sepsis-Modell in Mäusen gezeigt werden, dass auch eine inflammatorische Reaktion bei gleichzeitiger vasodilatatorischer Wirkung von Stickstoffmonoxid zu einer Verschlechterung der Hämodynamik führt ⁸³, sodass im Folgenden die mögliche Rolle vom systemisch-inflammatorischen "Response"-Syndrom (SIRS) und SIDS im AIS-Geschehen diskutiert wird.

4.3.5 Immunologische Veränderungen als mögliche Ursache kardiovaskulärer Ereignisse nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie

Es ist bekannt, dass das Immunsystem in Folge eines AIS in einem komplexen Zusammenhang mit dem Schlaganfallgeschehen steht.^{84, 85} Klinische Beobachtungen nach einem Schlaganfallgeschehen zeigten eine systemische Entzündungsreaktion mit einer Erhöhung des CRPs und des IL-6, die eine negative Auswirkung auf die Langzeitprognose haben.^{47, 48}

Ausschlaggebend für die vorliegende primär inflammatorische Reaktion zeigte sich bei den durchflusszytometrischen Analysen der Blutzellen und der Milz nach Mediaokklusion eine vermehrte Anzahl an Granulozyten. Zudem konnte systemisch ein Anstieg an IL-1ß, IL-6, sowie tendenziell ebenfalls an IL-10 und TNFα, beobachtet werden. Ebenso zeigten sich bei der Bestimmung des SAP signifikant höhere Werte, die auf einen entzündlichen Prozess hinweisen. Auf Grund seiner höheren Konzentration in der Maus wird SAP dem in der Humanmedizin verwendeten CRP in der Diagnostik von inflammatorischen Prozessen vorgezogen.⁸⁶

Interessanterweise manifestierte sich diese Entzündungsreaktion im myokardialen Gewebe in Form einer Granulozytose. Zudem konnte hier ein Trend zu erhöhtem IL-1ß, IL-6 sowie IL-10 und TNFα beobachtet werden. Dies wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Diese Ergebnisse sollten durch eine Erhöhung der n-Zahl statistisch gesichert werden.

Im Kleintiermodell wurde in der subakuten Phase nach einem ischämischen Schlaganfallgeschehen eine Immunsuppression beobachtet, die 96 Stunden nach Schlaganfallinduktion mit einer Atrophie der Milz, einer Lymphopenie ⁸⁷, sowie einer Verschiebung der proinflammatorischen Th1-Typ-Zytokine zu antiinflammatorischen Th2-Zytokinen und einer T-Zell-Erhöhung einhergeht.⁴⁵ Es ist bekannt, dass die Milz aufgrund inflammatorischer Komponenten einen Einfluss auf das Herz hat: so konnte gezeigt werden, dass eine Splenektomie bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Stagnierung der Umbauprozesse im Myokard führt.⁸⁸

Ein weiterer Aspekt könnte die intraindividuelle Magen-Darm-Besiedlung der Versuchstiere sein, die einen Einfluss auf verschiedenste pathologische Effekte haben kann.⁸⁹ Hierzu wurde bereits gezeigt, dass der mikrobielle Status im Zusammenhang mit der Progression von kardiovaskulären Ereignissen wie Herzinsuffizienz und Artheriosklerose stehen kann.⁹⁰ In den vorliegenden Versuchen wurden jedoch keine mikrobiome Analysen berücksichtigt.

4.3.6 Anstieg des zirkulierenden Troponins auf Grund einer myokardialen Strukturschädigung

HsTnT stieg 24 Stunden nach Mediaokklusion im Plasma nachweislich an, sodass eine Schädigung des Myokards vorliegen musste.⁹¹

Auswertung der HE- und TTC-Färbungen ergaben allerdings keine morphologisch sichtbaren Veränderungen der Zellen im Vergleich zu Sham-Tieren. Bei den Auswertungen der Gefrierschnitte wurde beobachtet, dass auf Grund mechanischer Sensibilität vereinzelt aufgetriebene Zellen und Diskontinuität in beiden Gruppen vorlagen bzw. TTC-negative Anteile des Herzens (Perikard) zur Darstellung kamen, die jedoch als Artefakte zu werten waren.⁹² Somit konnte auf Basis dieser Färbung keine relevante Aussage bezüglich einer möglichen Ursache für die Erhöhung des hsTnTs im Plasma getroffen werden. Bezüglich der Ausschüttung von hsTnT gibt es im Rahmen der Ischämie zwei Phasen, die der Freisetzung des hsTnTs aus dem Zytoplasma und Zytoskelett entsprechen.⁹³ Hinsichtlich des gewählten Zeitpunkts stellten 24 Stunden postoperativ ein relativ kurzes Zeitintervall dar, um bereits mögliche nekrotische oder fibrotische Prozesse zu visualisieren.

In diesem Zusammenhang sind die kernspintomographischen Veränderungen der T1- und T2-Relaxationszeiten von Herzen nach tMCAO zu nennen. Eine mögliche Erklärung für eine verkürzte T2-Zeit ist, dass aufgrund der herabgesetzten Herzfunktion die Sauerstoffversorgung im geschädigten Bereich verschlechtert war, was zur Folge hatte, dass sich hier mehr desoxygeniertes Hämoglobin ansammelte (vgl. BOLD-Effekt).⁹⁴ Zusätzlich gab eine Verlängerung der T1-Zeit einen Hinweis auf eine Erweiterung des extrazellulären Raums im Myokardgewebe, welcher ebenfalls als eine Veränderung der myokardialen Textur zu werten ist. Veränderungen der T1-Zeit werden auch bei der akuten Myokarditis beobachtet.95

Um die Rolle der Apoptose zu untersuchen, erfolgte in weiteren Untersuchungen immunhistochemisch mittels TUNEL-Färbung eine Detektion auf mögliche apoptotische Zellen. Apoptose ist eine mögliche myozytäre Reaktion auf Inflammation und würde nicht mit einer strukturellen Veränderung im Rahmen einer HE- oder TTC-Färbung sichtbar gemacht werden können. Das Enzym "terminale Desoxyribonukleotidyltransferase" (TdT) bindet hierbei fluoreszenzgekoppelt an freie Hydroxylgruppen von defragmentierten DNA-Strängen an. In tMCAO-operierten Herzen zeigten sich vermehrt einzelne DAPI- und TUNEL-positive Zellen, die diffus im Herzgewebe verteilt waren, welches die Hypothese des Zelluntergangs stützte.

In der Literatur wird die TUNEL-Färbung zur Aufdeckung von Apoptose allerdings pathophysiologisch umstritten diskutiert, da diese nur einen Moment der verschiedenen Abbauprozesse beziehungsweise Untergangsformen einer Zelle dokumentiert.⁹⁶

Im vorliegenden Fall könnten die Apoptose-positiven Zellen allerdings als Indikator für eine Strukturveränderung, die sich im zeitlichen Verlauf als Nekrose darstellen, gewertet werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassung: Die vorliegende Arbeit diente der Etablierung eines murinen Schlaganfallmodells und dessen kardiovaskulärer Auswirkungen, welches die humanen Schlaganfallereignisse möglichst imitieren sollte.

Ein akuter ischämischer Schlaganfall und die damit einhergehenden kardiovaskulären Auswirkungen führen häufig zum Tod. Trotz intensiver Forschung bleiben die komplexen Zusammenhänge hier nicht ausreichend verstanden. Eine kardioprotektive, therapeutische Intervention, die ursächliche Kaskaden blockiert, ist weiterhin nicht gegeben. Experimentell konnte jedoch in einer Langzeitstudie schon gezeigt werden, dass die Gabe von Betablockern nach einem akutem ischämischen Schlaganfall (AIS) bei Mäusen eine sekundäre Herzinsuffizienz verhindert.⁷¹

Mittels transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) wurde bei 109 C57BL/6J Mäusen rechtsseitig ein ischämischer Schlaganfall für 60 Minuten induziert. Im Anschluss erfolgten 24 Stunden später kardiovaskuläre Untersuchungen mittels Elektrokardiogramms, Echokardiographie, Magnetresonanztomographie, Millar-Katheter Messungen, Histologie, Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) und die Bestimmung des kardialen hochsensitiven Troponin Ts (hsTnT) im Plasma. Zudem wurden die zirkulierenden Katecholamine mit Hilfe des HPLC- und ELISA-Verfahrens sowie Entzündungszellen mittels FACS-Analyse untersucht.

Das murine Modell konnte erfolgreich etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der ischämische Schlaganfall in der akuten Phase zu einem Anstieg des kardialen hsTnT im Blutplasma führte. Weiter konnte eine Bradykardie mit veränderter Herzfrequenzvariabilität sowie einer systolischen und diastolischen Dysfunktion beobachtet werden. Ergebnisse der Magnetresonanztomographie und Histologie wiesen hierbei auf eine myokardiale Schädigung hin. Schlaganfalloperierte Tiere zeigten zudem eine systemische und kardiale Entzündungsreaktion.

Ausblick: Um den genauen Mechanismus weiter aufzuschlüsseln, sind in näherer Zukunft Untersuchungen mit künstlicher Beeinflussung des vegetativen Nervensystems (Stimulation) sowie der Einsatz von antiinflammatorischen Substanzen geplant, die womöglich zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führen könnten.

Eine interessante Fragestellung ist weiterhin inwieweit das Nervensystem eine Rolle bei der Vermittlung eines Signals nach AIS spielt. Hierbei sollte noch einmal näher überprüft werden, welchen Einfluss das vegetative, aber auch das endokrine System haben könnte.

Parallel zu weiteren experimentellen Untersuchungen wurde eine klinische Studie in Kooperation zwischen der Klinik für Neurologie und der Klinik für Kardiologie erstellt, die bei AIS-Patienten eine Bestimmung des hsTnTs sowie eine kardiale MRT-Untersuchung bei einer Erhöhung des hsTnTs >50 ng/L vorsieht.

6 SUMMARY

Systemic interactions between the ischemic brain and the heart

Objectives: To implement a murine model of reperfused acute ischemic stroke (AIS) to study local cardiac and circulatory adaptations

Background: Cardiac prognosis in patients with AIS is impaired. Frequent coincidental findings after AIS are systemic inflammation and release of high sensitive Troponin T (hsTnT) with cardiac dysfunction. The nature of cardiac dysfunction and potential therapeutic targets are not known. Standardized models to investigate systemic interferences of the brain-heart-axis and the underlying mechanisms of AIS induced cardiac dysfunction are missing.

Methods: Ischemic stroke was induced in 109 C57BL/6J mice by transient right-sided middle cerebral artery occlusion (tMCAO). Cardiac effects were investigated by electrocardiograms, 3D echocardiography, magnetic resonance imaging (MRI), invasive conductance catheter measurements, histology, flow cytometry and determination of plasma hsTnT. Systemic hemodynamics were assessed by conductance catheter measurements. Circulating catecholamines were determined by HPLC and immune-assays. Inflammatory markers were analyzed by flow cytometry.

Results: Following tMCAO hsTnT levels were elevated 4-fold compared to sham-operated controls. tMCAO caused a systolic left ventricular dysfunction with significantly reduced stroke volume and impaired global longitudinal strain. Concomitantly reduced cardiac output, impaired ventricular pressure development, and lower mean arterial pressure were observed. Paradoxically, we observed a severe bradycardia. This was accompanied by a systemic inflammatory response characterized by granulocytosis, lymphopenia, increased levels of serum-amyloid A, and interleukin-6. Within myocardial tissue, we noted altered expansion of extracellular space as evidenced by MRI relaxometry, and in parallel number of granulocytes, apoptotic cells, and expression of pro-inflammatory cytokines were elevated.

Conclusion: The brain-heart-axis frequently induces specific patterns of cardiac and circulatory adaption to AIS. Acute myocardial infarction does not contribute to this interaction. But an acute myocardial injury with systolic dysfunction and reduced cardiac output occurs, which is accompanied by altered myocardial tissue characteristics associated with a systemic and local myocardial inflammatory response.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1. (WHO) WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2010
- 2. Kjellstrom T, Norrving B, Shatchkute A. Helsingborg declaration 2006 on european stroke strategies. *Cerebrovascular diseases*. 2007;23:231-241
- 3. Scheitz JF, Mochmann HC, Erdur H, Tutuncu S, Haeusler KG, Grittner U, et al. Prognostic relevance of cardiac troponin t levels and their dynamic changes measured with a high-sensitivity assay in acute ischaemic stroke: Analyses from the trelas cohort. *International journal of cardiology*. 2014;177:886-893
- 4. Chen Z, Venkat P, Seyfried D, Chopp M, Yan T, Chen J. Brain-heart interaction: Cardiac complications after stroke. *Circulation research*. 2017;121:451-468
- 5. Krause T, Werner K, Fiebach JB, Villringer K, Piper SK, Haeusler KG, et al. Stroke in right dorsal anterior insular cortex is related to myocardial injury. *Annals of neurology*. 2017;81:502-511
- 6. Mochmann HC, Scheitz JF, Petzold GC, Haeusler KG, Audebert HJ, Laufs U, et al. Coronary angiographic findings in acute ischemic stroke patients with elevated cardiac troponin: The troponin elevation in acute ischemic stroke (trelas) study. *Circulation*. 2016;133:1264-1271
- 7. Yoshimura S, Toyoda K, Ohara T, Nagasawa H, Ohtani N, Kuwashiro T, et al. Takotsubo cardiomyopathy in acute ischemic stroke. *Annals of neurology*. 2008;64:547-554
- 8. Veltkamp PDR. Akutherapie des ischämischen schlaganfalls. 2012
- 9. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-725
- 10. Ay H, Furie KL, Singhal A, Smith WS, Sorensen AG, Koroshetz WJ. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Annals of neurology*. 2005;58:688-697
- 11. Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: Facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovascular diseases*. 2004;17 Suppl 1:153-166
- 12. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391-397
- 13. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU. [incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*. 2002;70:657-662
- 14. Byer E, Ashman R, Toth LA. Electrocardiograms with large, upright t waves and long q-t intervals. *Am Heart J*. 1947;33:796-806
- 15. Samuels MA. The brain-heart connection. *Circulation*. 2007;116:77-84
- 16. Tranmer BI, Keller TS, Kindt GW, Archer D. Loss of cerebral regulation during cardiac output variations in focal cerebral ischemia. *Journal of neurosurgery*. 1992;77:253-259
- 17. Cheshire WP, Jr., Saper CB. The insular cortex and cardiac response to stroke. *Neurology*. 2006;66:1296-1297
- 18. van der Bilt IA, Hasan D, Vandertop WP, Wilde AA, Algra A, Visser FC, et al. Impact of cardiac complications on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A meta-analysis. *Neurology*. 2009;72:635-642
- 19. Zeus T, Ketterer U, Leuf D, Dannenberg L, Bonner F, Wagstaff R, et al. Safety of percutaneous coronary intervention in patients with acute ischemic stroke/transient ischemic attack and acute coronary syndrome. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2016;105:356-363

LITERATURVERZEICHNIS

- 20. Khechinashvili G, Asplund K. Electrocardiographic changes in patients with acute stroke: A systematic review. *Cerebrovascular diseases*. 2002;14:67-76
- 21. Smith KE, Hachinski VC, Gibson CJ, Ciriello J. Changes in plasma catecholamine levels after insula damage in experimental stroke. *Brain research*. 1986;375:182-185
- 22. Soros P, Hachinski V. Cardiovascular and neurological causes of sudden death after ischaemic stroke. *The Lancet. Neurology*. 2012;11:179-188
- 23. Tokgozoglu SL, Batur MK, Topcuoglu MA, Saribas O, Kes S, Oto A. Effects of stroke localization on cardiac autonomic balance and sudden death. *Stroke*. 1999;30:1307-1311
- 24. Tahsili-Fahadan P, Geocadin RG. Heart-brain axis: Effects of neurologic injury on cardiovascular function. *Circulation research*. 2017;120:559-572
- 25. Anders B, Alonso A, Artemis D, Schafer A, Ebert A, Kablau M, et al. What does elevated highsensitive troponin i in stroke patients mean: Concomitant acute myocardial infarction or a marker for high-risk patients? *Cerebrovascular diseases*. 2013;36:211-217
- 26. Kerr G, Ray G, Wu O, Stott DJ, Langhorne P. Elevated troponin after stroke: A systematic review. *Cerebrovascular diseases*. 2009;28:220-226
- 27. Scheitz JF, Nolte CH, Laufs U, Endres M. Application and interpretation of high-sensitivity cardiac troponin assays in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46:1132-1140
- 28. Faiz KW, Thommessen B, Einvik G, Brekke PH, Omland T, Ronning OM. Determinants of high sensitivity cardiac troponin t elevation in acute ischemic stroke. *BMC neurology*. 2014;14:96
- 29. Abboud H, Berroir S, Labreuche J, Orjuela K, Amarenco P, Investigators G. Insular involvement in brain infarction increases risk for cardiac arrhythmia and death. *Annals of neurology*. 2006;59:691-699
- 30. Prosser J, MacGregor L, Lees KR, Diener HC, Hacke W, Davis S, et al. Predictors of early cardiac morbidity and mortality after ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38:2295-2302
- 31. Rauh R, Fischereder M, Spengel FA. Transesophageal echocardiography in patients with focal cerebral ischemia of unknown cause. *Stroke*. 1996;27:691-694
- Hurst RT, Prasad A, Askew JW, 3rd, Sengupta PP, Tajik AJ. Takotsubo cardiomyopathy: A unique cardiomyopathy with variable ventricular morphology. *JACC. Cardiovascular imaging*. 2010;3:641-649
- 33. Tsuchihashi K, Ueshima K, Uchida T, Oh-mura N, Kimura K, Owa M, et al. Transient left ventricular apical ballooning without coronary artery stenosis: A novel heart syndrome mimicking acute myocardial infarction. Angina pectoris-myocardial infarction investigations in japan. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;38:11-18
- 34. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 esc guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with st-segment elevation. *Revista espanola de cardiologia*. 2017;70:1082
- 35. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Journal of the American College of Cardiology*. 2018
- 36. Agewall S, Beltrame JF, Reynolds HR, Niessner A, Rosano G, Caforio AL, et al. Esc working group position paper on myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries. *European heart journal*. 2017;38:143-153
- 37. Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, et al. Stroke-induced immunodepression: Experimental evidence and clinical relevance. *Stroke*. 2007;38:770-773

- 38. Dziewas R, Ritter M, Schilling M, Konrad C, Oelenberg S, Nabavi DG, et al. Pneumonia in acute stroke patients fed by nasogastric tube. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75:852-856
- 39. Flogel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, et al. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2008;118:140-148
- 40. Audebert HJ, Rott MM, Eck T, Haberl RL. Systemic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis. *Stroke*. 2004;35:2128-2133
- 41. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184:53-68
- 42. Kalita J, Bastia J, Bhoi SK, Misra UK. Systemic inflammatory response syndrome predicts severity of stroke and outcome. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2015;24:1640-1648
- 43. Boehme AK, Kapoor N, Albright KC, Lyerly MJ, Rawal PV, Bavarsad Shahripour R, et al. Predictors of systemic inflammatory response syndrome in ischemic stroke undergoing systemic thrombolysis with intravenous tissue plasminogen activator. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2014;23:e271-276
- 44. Boysen G, Christensen H. Stroke severity determines body temperature in acute stroke. *Stroke*. 2001;32:413-417
- 45. Prass K, Meisel C, Hoflich 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. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198:725-736
- 46. Hajat C, Hajat S, Sharma P. Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome : A meta-analysis of studies in patients. *Stroke*. 2000;31:410-414
- 47. Muir KW, Weir CJ, Alwan W, Squire IB, Lees KR. C-reactive protein and outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 1999;30:981-985
- 48. Pusch G, Debrabant B, Molnar T, Feher G, Papp V, Banati M, et al. Early dynamics of pselectin and interleukin 6 predicts outcomes in ischemic stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2015;24:1938-1947
- 49. Ishikawa H, Tajiri N, Vasconcellos J, Kaneko Y, Mimura O, Dezawa M, et al. Ischemic stroke brain sends indirect cell death signals to the heart. *Stroke*. 2013;44:3175-3182
- 50. Lubjuhn J. Verhaltenstestung in einem schlaganfallmodell der maus 2010
- 51. Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, Eckenstein F. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurological research*. 1997;19:641-648
- 52. 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;17:472-476
- 53. Erkens R, Kramer CM, Luckstadt W, Panknin C, Krause L, Weidenbach M, et al. Left ventricular diastolic dysfunction in nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of serca2a, and preserved endothelial function. *Free radical biology & medicine*. 2015;89:906-917
- 54. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, 3rd, Dokainish H, Edvardsen T, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by

echocardiography: An update from the american society of echocardiography and the european association of cardiovascular imaging. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2016;17:1321-1360

- 55. Haberkorn SM, Jacoby C, Ding Z, Keul P, Bonner F, Polzin A, et al. Cardiovascular magnetic resonance relaxometry predicts regional functional outcome after experimental myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 2017;10
- 56. Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance: Twenty-first century solutions in cardiology. *Clinical medicine*. 2003;3:273-278
- 57. Kim PK, Hong YJ, Im DJ, Suh YJ, Park CH, Kim JY, et al. Myocardial t1 and t2 mapping: Techniques and clinical applications. *Korean journal of radiology*. 2017;18:113-131
- 58. Borg N. Die rolle der ekto-5`-ektonukleotidase (cd 73)bei der entzündungsreaktion nach herzinfarkt in der maus.
- 59. Bonner F, Jacoby C, Temme S, Borg N, Ding Z, Schrader J, et al. Multifunctional mr monitoring of the healing process after myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2014;109:430
- 60. Bonner F, Janzarik N, Jacoby C, Spieker M, Schnackenburg B, Range F, et al. Myocardial t2 mapping reveals age- and sex-related differences in volunteers. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2015;17:9
- 61. Kleinschnitz C, Blecharz K, Kahles T, Schwarz T, Kraft P, Gobel K, et al. Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*. 2011;42:1081-1089
- 62. Bonner F, Borg N, Burghoff S, Schrader J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes cd39 and cd73 after ischemic injury. *PloS one*. 2012;7:e34730
- 63. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91
- 64. Kamii H, Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Epstein CJ, Chan PH. Prolonged expression of hsp70 mrna following transient focal cerebral ischemia in transgenic mice overexpressing cuzn-superoxide dismutase. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1994;14:478-486
- 65. Lo EH, Hara H, Rogowska J, Trocha M, Pierce AR, Huang PL, et al. Temporal correlation mapping analysis of the hemodynamic penumbra in mutant mice deficient in endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Stroke*. 1996;27:1381-1385
- 66. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1981;1:53-60
- 67. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of neurology*. 1985;17:497-504
- 68. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice middle cerebral artery occlusion with the filament model. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011
- 69. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30:923-934

- Min J, Farooq MU, Greenberg E, Aloka F, Bhatt A, Kassab M, et al. Cardiac dysfunction after left permanent cerebral focal ischemia: The brain and heart connection. *Stroke*. 2009;40:2560-2563
- 71. Bieber M, Werner RA, Tanai E, Hofmann U, Higuchi T, Schuh K, et al. Stroke-induced chronic systolic dysfunction driven by sympathetic overactivity. *Annals of neurology*. 2017;82:729-743
- 72. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in mice. *Current protocols in mouse biology*. 2011;1:71-83
- 73. Christensen H, Boysen G, Christensen AF, Johannesen HH. Insular lesions, ecg abnormalities, and outcome in acute stroke. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005;76:269-271
- 74. Swenne CA. Baroreflex sensitivity: Mechanisms and measurement. *Netherlands heart journal: monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 2013;21:58-60
- 75. Manea MM, Comsa M, Minca A, Dragos D, Popa C. Brain-heart axis--review article. *Journal of medicine and life*. 2015;8:266-271
- 76. Oppenheimer S, Cechetto D. The insular cortex and the regulation of cardiac function. *Comprehensive Physiology*. 2016;6:1081-1133
- 77. 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. *Journal of neuroscience methods*. 2009;184:95-103
- 78. De Raedt S, De Vos A, De Keyser J. Autonomic dysfunction in acute ischemic stroke: An underexplored therapeutic area? *Journal of the neurological sciences*. 2015;348:24-34
- 79. Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Triedman JK, Berul CI. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2000;279:H733-740
- 80. Templin C, Ghadri JR, Diekmann J, Napp LC, Bataiosu DR, Jaguszewski M, et al. Clinical features and outcomes of takotsubo (stress) cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*. 2015;373:929-938
- 81. Yoshikawa T. Takotsubo cardiomyopathy, a new concept of cardiomyopathy: Clinical features and pathophysiology. *International journal of cardiology*. 2015;182:297-303
- 82. Treib JH, Anton; Schmid-Schönbein, Holger; Fröhlig, Gerd. Bedeutung der hämodynamik beim akuten hirninfarkt. *Dt Ärztebl 1999; 96: A-553-556 [Heft 9]*. 1999
- van de Sandt AM, Windler R, Godecke A, Ohlig J, Zander S, Reinartz M, et al. Endothelial nos (nos3) impairs myocardial function in developing sepsis. *Basic research in cardiology*. 2013;108:330
- 84. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *Journal of cardiovascular translational research*. 2013;6:834-851
- 85. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature medicine*. 2011;17:796-808
- 86. Pepys MB, Baltz M, Gomer K, Davies AJ, Doenhoff M. Serum amyloid p-component is an acute-phase reactant in the mouse. *Nature*. 1979;278:259-261
- 87. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory t cells and circulating macrophages. *Journal of immunology*. 2006;176:6523-6531

- 88. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: Critical importance of the cardiosplenic axis. *Circulation research*. 2014;114:266-282
- 89. Bleich A, Hansen AK. Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012;35:81-92
- 90. Kitai T, Tang WHW. Gut microbiota in cardiovascular disease and heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:85-91
- 91. Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, Hong L, Apple FS. Myocardial tissue troponins t and i. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2003;12:65-71
- 92. Hunt CJ, Song YC, Bateson EA, Pegg DE. Fractures in cryopreserved arteries. *Cryobiology*. 1994;31:506-515
- 93. Remppis A, Scheffold T, Greten J, Haass M, Greten T, Kubler W, et al. Intracellular compartmentation of troponin t: Release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1995;27:793-803
- 94. Ogawa S. Finding the bold effect in brain images. *NeuroImage*. 2012;62:608-609
- 95. Lurz P, Luecke C, Eitel I, Fohrenbach F, Frank C, Grothoff M, et al. Comprehensive cardiac magnetic resonance imaging in patients with suspected myocarditis: The myoracer-trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67:1800-1811
- 96. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology*. 1995;21:1465-1468

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	7AAD A. Aa. AIS ATP AZ	7-Aminoactinomycin Arteria Arteriae Akuter ischämischer Schlaganfall Adenosin-Tri-Phosphat Aktenzeichen
В	BD B-Mode BNP BOLD-Effekt BP _{sys} BP _{dias} BP _{mean} BSA	Becton Dickison "Brightness-Mode" B-Typ natriuretisches Peptid Blood-Oxygenation-Level Dependent Effekt systolischer Blutdruck diastolischer Blutdruck mittlerer arterieller Blutdruck Bovines Serumalbumin
С	Ca ²⁺ CABG CARID CAT CD CO CO ₂ CRP	Calcium "Coronary artery bypass graft" "Cardiovascular Research Institute Düsseldorf" Katecholamine "Clusters of Differentiation" "Cardiac Output" (Herzzeitvolumen) Kohlenstoffdioxid C-reaktives Protein
D	DAPI DNA dP/dt	4',6-Diamidin-2-phenylindol "Desoxynuclein Acid" "delta pressure/ delta time"
E	EDTA EDV EF EGTA EKG ELISA	Ethylendiamintetraessigsäure Enddiastolisches Volumen Ejektionsfraktion Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure Elektrokardiogramm "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"

E	ESC EDP ESP ESV	"European Society of Cardiology" Enddiastolischer Druck Endsystolischer Druck Endsystolisches Volumen
F	FACS FELASA FS FSC	"Fluorescence activated cell sorting" "Federation for Laboratory Animal Science Associations" "Fractional Shortening" (fraktionelle Verkürzung) "forward scatter"
G	GLS	"Global longitudinal Strain"
Н	HBSS HE HEPES HF HF-band HPLC HRV hsTnT H_2O Hz	 "Hank's Balanced Salt Solution" Hämatoxylin-Eosin 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure Herzfrequenz "high frequency band" "High Performance Liquid Chromotography" "heartrate variability" (Herzfrequenzvariabilität) hochsensitives Troponin T Wasser Hertz
I	lgG lgM IL INFγ	Immunglobulin G Immunglobulin M Interleukin Interferon gamma
J		
к	K⁺ KCl	Kalium Kaliumchlorid
L	LA LANUV NRW LF-band LV	linker Vorhof Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen "low frequency band" linker Ventrikel

L	LVDP LVEDP LVESP LVOT	"Left ventricular developed pressure" "Left ventricular enddiastolic pressure" "Left ventricular endsystolic pressure" linksventrikulärer Ausflusstrakt
Μ	MACS MAP MgCl ₂ MHC MINOCA M-Mode MRT ms	 "magnetic cell separation" "mean arterial pressure" (mittlerer arterieller Druck) Magnesiumchlorid "Major Histocompatibility Complex" "Myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries" "Motion- Mode" Magnetresonanztomographie Millisekunden
Ν	Na ⁺ NaCl NaHCO ₃ Na₂HPO₄ NK-Zellen N. NN NPV	Natrium Natriumchlorid Natriumhydrogenphosphat Di-Natrium-hydrogenphosphat-dihydrat Natürliche Killerzellen Nervus "normal-to-normal interval" Negativer prädiktiver Wert
0	O ₂ OP	Sauerstoff Operation
Ρ	PBS PFA pMCAO PZN PCI PPV	"Phosphate buffered Saline" Paraformaldehyd permantene Okklusion der mittleren Hirnarterie Pharmazentralnummer Perkutane koronare Intervention Positiver prädiktiver Wert
Q		
R	rcf rpm RV	"relative centrifugal force" "revolutions per minute" rechter Ventrikel

S	SAP SEN SIDS SIRS SPE SSC SV SRe	Serum- Amyloid- Protein Sensitivität "stroke-induced immunodepression" systemisch-inflammatorisches "Response"-Syndrom Spezifität "sideward scatter" Schlagvolumen "Strain Rate e-wave"
т	TdT TEE tMCAO TNFα TPR TTC TUNEL TRIS HCL	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase Transthorakale Echokardiographie "transient Middle Cerebral Artery Occlusion" Tumornekrosefaktor alpha "total peripheral resistance" Tetrazoliumchlorid "TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling" Tris-Aminomethan Hydrochlorid
U	UKD	Uniklinikum Düsseldorf
v	VS.	versus
W		
x		
Y		
z	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1 Versuchsaufbau zur Untersuchung des kardiovaskulären Phänotyps nach einem akuten ischämischen Schlaganfall 6
Abbildung	 Schematische Zeichnung der Operationsmethode der transienten Okklusion der
Abbildulig	mittleren Hirnarterie (tMCAO) zur Schlaganfallinduktion hei der Maus
Abbildung	 Veranschaulichung eines Mäuseherzens in der parasternalen Längsachse in der
Abbildulig	5 Veranschaulichung eines mausenerzens in der parasternalen Langsachse in der
Abbildung	Leinokardiographie
Abbildung	transienter Mediaekklusien
	transienten Mediaokkiusion
Abbildung	5 In-vivo-Aumanme einer Millar-Katheter-Ontersuchung in der Maus
Abbildung	6 Blutdruckkurve einer Maus gemessen mit einem Millarkatneter-System
Abbilaung	<i>T Druckkurve im linken ventrikel einer Maus gemessen mittels eines</i>
	Millarkatneter-Systems
Abbilaung	8 Tripnenyi-tetrazoilum-chiorid (TTC)getarbtes Großnirn einer Maus nach transienter
	Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)
Abbildung	9 Schematische Darstellung der Antikörper und der Gating-Strategie der
	durchflusszytometrischen Analysen (FACS)
Abbildung	10 Vier-Feldertafel zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität und positiven und negativen
	Prädiktionswerten
Abbildung	11 Ubersicht über die Einteilung der Mäuse nach transienter Okklusion der mittleren
	Hirnarterie (tMCAO) in den verschiedenen Untersuchungen
Abbildung	12 Übersicht über die Einteilung der Kontrolltiere in den verschiedenen Untersuchungen 42
Abbildung	13 Eine 60-minütige transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte zu einer
	durchschnittlichen Insultgröße von 30 % 43
Abbildung	14 Eine transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) für 60 Minuten führte nach
	24 Stunden bei 75 % der Tiere zu höheren hochsensitiven Troponin T (hsTnT)-Werten.
Abbildung	15 Die Mehrheit der Tiere nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)
	zeigten 24 Stunden nach Intervention hochsensitive Troponin T (hsTnT)-Werte
	zwischen 14-80 ng/l
Abbildung	16 Eine Korrelation zwischen hochsensitivem Troponin T (hsTnT) und der Hirninsultgröße
	von Mäusen nach Schlaganfall konnte nicht beobachtet werden
Abbildung	17 Anhand der Vier-Feldertafel konnte für diese Versuche ein positiver Vorhersagewert für
	eine Insulabeteiligung in Abhängigkeit von hochsensitivem Troponin T (hsTnT) von
	86,6 % ermittelt werden 46
Abbildung	18 Die transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte 24 Stunden nach
	Intervention zu einer höheren Granulozytenanzahl im Blutplasma von Tieren nach
	Schlaganfall im Vergleich zu Sham-operierten Tieren
Abbildung	19 Die transiente Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) führte zu weniger
	zirkulierenden B-Lymphozyten verglichen zu Sham-operierten Mäusen
Abbildung	20 Im Blutplasma von Schlaganfall-operierten Tieren konnte im Vergleich zu Sham-
	operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention eine signifikant höhere Konzentration
	von Interleukin-6 (IL-6) festgestellt werden
Abbildung	21 Im Gruppenvergleich zeigten sich 24 Stunden nach Intervention keine Unterschiede
-	von Interleukin (IL)-1β-, -10- und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα)-Konzentrationen
	zwischen Sham- und Schlaganfall-Tieren 49
Abbildung	22 Im Vergleich zu Sham-Tieren wurden bei Tieren nach transienter Okklusion der
5	mittleren Hirnarterie (tMCAO) höhere Werte von Serumamyloid P (SAP) gemessen 50
Abbildung	23 In der Milz wurden 24 Stunden nach Intervention höhere Granulozyten-Konzentrationen
5	in Tieren nach Schlaganfall im Vergleich zu Sham-operierten Tieren gemessen 50

Abbildung 24	In der Milz führte die Schlaganfall-Operation im Gegensatz zur Sham-Operation nach 24 Stunden zu einer niedrigeren T-Lymphozytenkonzentration
Abbildung 25	24 Stunden nach Intervention wurde in Schlaganfall-operierten Tieren eine höhere
Abbildung 26	Anzahl an Granulozyten im Herzgewebe gefunden als in Sham-operierten Tieren 52 Im Herzgewebe von Tieren nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO) zeigten sich Tendenzen von höheren Interleukin (IL)-1β
Abbildung 27	und -6-Konzentrationen im Vergieich zu Snam-operierten Tieren
Abbildung 28	Bei Schlaganfall-operierten Tieren konnte im Vergleich zu Sham-operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention tendenziell höhere Adrenalinkonzentrationen festgestellt werden
Abbildung 29	Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Vergleich zu Sham-operierten Tieren
	24 Stunden nach Intervention niedrigere Blutdruckwerte
Abbildung 30	Die Druckmessung im linken Ventrikel zeigte 24 Stunden nach Intervention bei Tieren nach transienter Okklusion (tMCAO) der mittleren Hirnarterie in der Systole signifikant kleinere Werte als bei Sham-Tieren
Abbildung 31	Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Gegensatz zu Sham-operierten Tieren in der
	systolischen Druckentwicklung 24 Stunden nach Intervention signifikant kleinere Werte.
Abbildung 22	Die Schlegenfell Operation führte im Versleich zur Shom Operation 24 Stunden nach
Abbildung 32	Die Schlaganian-Operation funite im Vergleich zur Snam-Operation 24 Stunden nach
Abbilduna 33	Schlaganfall-operierte Tiere zeigten signifikant kleinere Herzzeitvolumen (HZV)-Werte
, is shading oo	als Sham-operierte Tiere
Abbildung 34	Die Werte des Herzfunktionparameters "Fractional Shortening" (FS) waren bei
0	Schlaganfall-Tieren signifikant kleiner als bei Sham-Tieren.
Abbildung 35	Schlaganfall-operierte Tiere zeigten im Vergleich zu Sham-Tleren 24 Stunden nach
	Intervention signifikant größere Werte bei der Messung des globalen longitudinalen Strains (GLS)
Abbildung 36	Die Strainrate (SRe)-Werte waren bei Tieren nach Schlaganfall im Gegensatz zu
Abbilduna 07	Sham-Tieren 24 Stunden nach Intervention signifikant kleiner
Abbildung 37	Herzfreguenzwerte und eine höhere Herzfreguenzvariabilität bei Schlaganfall-Tieren
	als bei Sham-Tieren
Abbildung 38	Herzfrequenzvariabilitätsmessung im "low- (LF)" und "high frequency band (HF)"
	zeigten nach 24 Stunden tendenzielle Unterschiede zwischen Schlaganfall- und Sham-
	Tieren
Abbildung 39	Magnetresonanztomographische (MRT)-Messungen 24 Stunden nach Schlaganfall
	<i>zeigten verlängerten T1-Relaxationszeiten.</i> 63
Abbildung 40	Schlagantall-operierte Tiere wiesen verkurzte 12-Relaxationszeiten auf
Abbildung 41	eine höhere Anzahl an DAPI- und TUNEL-positiven Zellen im Herzgewebe
Abbildung 42	Repräsentative Aufnahmen der Apoptose-Färbung von Herzen von Sham- und
- J	Schlaganfall-operierten Tieren 24 Stunden nach Intervention
Abbildung 43	Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Druckverlaufs im linken Ventrikel 24 Stunden nach transienter Okklusion der mittleren Hirnarterie (tMCAO)- und
	Sham-Operation

8.3 Tabellenverzeichnis

 Tabelle 1
 Klinisch- neurologisches Bewertungssystem nach einem Schlaganfall nach Bederson ⁵². 9

8.4 Formelverzeichnis

Formel 1	Berechnung des Schlagvolumens:	10
Formel 2	Berechnung des Herzzeitvolumens:	11
Formel 3	Berechnung der fraktionellen Verkürzung:	11
Formel 4	Berechnung der Ejektionsfraktion:	11
Formel 5	Berechnung des mittleren arteriellen Drucks	15
Formel 6	Berechnung des totalen peripheren Widerstands	15

9 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Poster-Präsentation auf der 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie im April 2018 unter dem Titel "Acute myocardial dysfunction following ischemic stroke in mice" Vornholz L, Maier O, Gliem M, Henning C, Flögel U, Kelm M, Gerdes N, Jander S, Bönner F

Manuskript "Circulatory Dysfunction Resembling Acute Heart Failure after Reperfused Ischemic Stroke"

Vornholz L, Gliem M, Nienhaus F, Alter C, Henning C, Wolff G, Clasen L, Rassaf T, Flögel U, Kelm, M, Gerdes N, Jander S^{*}, Bönner F^{*} (under review); ESC: Cardiovascular Research

10 DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. Christa Thöne-Reinecke, Herrn Prof. Dr. Martin Sager und Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold für die wohlwollende Unterstützung und Begutachtung meiner externen Promotion.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Malte Kelm und Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Hartung, die mir die Möglichkeit gegeben haben in ihrer jeweiligen medizinischen Einrichtung erste wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Florian Bönner, Herrn Prof. Dr. Sebastian Jander, Herrn Privatdozent Dr. Michael Gliem und Herrn Prof. Dr. Norbert Gerdes, die mich mit ihrem fachlichen Wissen immer tatkräftig und geduldig unterstützt haben und mir auch in der größten Verzweiflung neue Motivation gegeben haben.

Des Weiteren danke ich meinen lieben Kollegen aus dem kardiologischen und neurochemischen Labor und alle, die mich in irgendeiner Form unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die sowieso immer nur das Beste wollen und meinem Mann, der einfach großartig ist.

Zuletzt danke ich noch Emma Vornholz, die inzwischen auch ein weitreichendes Wissen im Fach der Neurologie, Kardiologie und Psychologie vorweisen kann.

11 FINANZIERUNGSQUELLEN / INTERESSENKONFLIKTE

a) Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell durch die Forschungskommission der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf (9772584), sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRL BO-4264/1-1 (Florian Bönner); CRC 1116 Projekte B06 (Malte Kelm), B02 (Ulrich Flögel); GEROK Stipendium (Fabian Nienhaus) unterstützt.

b) Interessenkonflikte

Es besteht kein Interessenkonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

12 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 20.05.2019

Lilian Vornholz



49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-978-5