

Evaluation von Effektivität und Sicherheit der niederfrequenten, transkraniellen Ultraschalltherapie beim Schlaganfall

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Peter R. Reuter
15. Juli 1979 in Wiesbaden

Mainz, 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | 1 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 6 |
| Tabellenverzeichnis..... | 9 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 10 |
| 1 Einleitung: | 1 |
| 1.1 Der Schlaganfall..... | 1 |
| 1.2 Therapie des Schlaganfalls..... | 2 |
| 1.3 Pathophysiologie des Schlaganfalls..... | 3 |
| 1.3.1 Die Penumbra..... | 3 |
| 1.3.2 Die postischämische Kaskade..... | 4 |
| 1.4 Versuchstiere in der Schlaganfallforschung..... | 8 |
| 1.5 Die Schlaganfallmodelle an der Ratte..... | 8 |
| 1.5.1 Das Fadenmodell..... | 9 |
| 1.6 Therapeutischer Ultraschall beim Schlaganfall (Sonothrombolyse)..... | 9 |
| 1.6.1 Grundlagen des Ultraschalls..... | 10 |
| 1.6.2 Verwendung von Ultraschall in der Medizin..... | 11 |
| 1.6.3 Entwicklung der Ultraschallthrombolyse..... | 12 |
| 1.6.3.1 Verschiedene Formen der experimentellen Ultraschallthrombolyse..... | 13 |
| 1.6.4 Wirkung von Ultraschall auf die Genexpression..... | 14 |
| 1.6.5 Auswahl von Kandidatengen zur Messung der Genexpression nach Ultraschallbehandlung..... | 16 |
| 1.7 Ziele der Arbeit..... | 17 |
| 2 Material und Methoden..... | 19 |
| 2.1 Versuchstiere..... | 19 |
| 2.2 Narkose..... | 19 |
| 2.3 Operationstechniken..... | 19 |
| 2.3.1 Fadenmodell – permanentes Verschlussmodell..... | 19 |
| 2.3.2 Fadenmodell – Reperfusionmodell..... | 20 |
| 2.4 Ultraschallprotokoll..... | 21 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.5 | Temperaturmessung..... | 23 |
| 2.6 | MRT-Technik..... | 23 |
| 2.6.1 | Fixierung der Versuchstiere..... | 23 |
| 2.6.2 | Der Magnetresonanztomograph (MRT)..... | 24 |
| 2.6.3 | Bildgebung..... | 25 |
| 2.6.3.1 | Positionierung der Versuchstiere..... | 25 |
| 2.6.3.2 | Feineinstellung der Positionierung..... | 25 |
| 2.6.3.3 | Diffusionsgewichtete Bildgebung..... | 25 |
| 2.6.3.4 | T2-Bildgebung..... | 26 |
| 2.6.3.5 | Protonen- und T2-gewichtete Bildgebung..... | 26 |
| 2.7 | Neurologische Beurteilung der Tiere..... | 27 |
| 2.8 | Perfusionsfixation..... | 28 |
| 2.9 | Probenentnahme..... | 29 |
| 2.10 | Histologie..... | 29 |
| 2.10.1 | TTC-Färbung..... | 29 |
| 2.10.1.1 | Planimetrie der histologischen Schnitte..... | 30 |
| 2.10.2 | Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)..... | 30 |
| 2.10.3 | Trichrom (Gomori Mixture):..... | 31 |
| 2.10.4 | Immunhistochemische Färbungen..... | 31 |
| 2.11 | Ultraschallgeräte..... | 32 |
| 2.12 | Versuchsmaterial für molekular-genetische Untersuchungen..... | 33 |
| 2.13 | Molekular-biologische Standardmethoden..... | 33 |
| 2.13.1 | RNA-Extraktion aus Gehirngewebe..... | 33 |
| 2.13.2 | Quantifizierung von Nukleinsäuren..... | 34 |
| 2.13.2.1 | Gelelektrophorese..... | 34 |
| 2.13.2.2 | RNA-Gele..... | 34 |
| 2.13.2.3 | DNA-Gele..... | 35 |
| 2.13.2.4 | cDNA-Synthese..... | 35 |
| 2.13.2.5 | PCR..... | 36 |
| 2.13.2.6 | Aufreinigung der PCR-Produkte..... | 37 |
| 2.13.3 | Klonierung von PCR-Produkten in einen Plasmidvektor..... | 37 |
| 2.13.3.1 | Transformation von elektrokompenten Bakterienzellen..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 2.13.3.2 Ansetzen von ÜberNacht-Kulturen „vermutlich“ positiver Klone..... | 38 |
| 2.13.3.3 Plasmidpräparation..... | 38 |
| 2.13.3.4 Restriktion..... | 38 |
| 2.13.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA..... | 39 |
| 2.13.3.6 Auswertung der Sequenzdaten..... | 39 |
| 2.13.4 Quantitative Real-Time RT-PCR..... | 39 |
| 2.13.4.1 Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR mit SYBR-Green..... | 39 |
| 2.13.4.2 Design spezifischer Primer..... | 41 |
| 2.13.4.3 Der Amplifikationsplot..... | 42 |
| 2.13.4.4 Auswertung der Q-PCR anhand von Standardplasmiden..... | 43 |
| 2.13.4.5 Normalisierung der Messdaten und Auswertung..... | 44 |
| 2.14 MikroArray Analysen..... | 45 |
| 2.14.1 Auswahl der Proben..... | 45 |
| 2.14.2 cDNA-Synthese und Markierung..... | 45 |
| 2.14.3 Hybridisierung der Mikroarrays..... | 45 |
| 2.14.4 Auswertung der Arrays..... | 46 |
| 2.14.5 HDMA Core-Facility..... | 48 |
| 2.15 Lösungen und verwendetes Material..... | 49 |
| 3 Ergebnisse:..... | 51 |
| 3.1 Wirkung von 60 kHz Ultraschall auf ischämisches Hirngewebe..... | 51 |
| 3.1.1 Ziel der Studie..... | 51 |
| 3.1.2 Auswertung der Daten..... | 52 |
| 3.1.2.1 Neurologische Auswertung..... | 52 |
| 3.1.2.2 MRT-Auswertung..... | 52 |
| 3.1.2.3 Mortalitätsrate..... | 52 |
| 3.1.2.4 Intrakranielles Temperaturmonitoring während der Ultraschallbehandlung..... | 53 |
| 3.1.2.5 Histologische Auswertung..... | 56 |
| 3.2 Einfluss der Duty Cycles-Einstellung auf das Auftreten unerwünschter Therapieeffekte..... | 58 |
| 3.2.1 Versuchsaufbau..... | 58 |
| 3.2.2 Ziel der Studie..... | 59 |
| 3.2.3 Auswertung der Daten..... | 60 |
| 3.2.3.1 Neurologische Auswertung..... | 60 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.3.2 Histologische Auswertung..... | 60 |
| 3.2.3.3 Mortalität..... | 61 |
| 3.2.3.4 Auswertung der Hörschwellenbestimmung..... | 61 |
| 3.3 Vergleich der Genexpression nach verschiedenen Ultraschallbehandlungen (60, 488 kHz und 3 MHz)..... | 64 |
| 3.3.1 Versuchsaufbau..... | 64 |
| 3.3.2 Ziel der Studie..... | 64 |
| 3.3.2.1 Messung der Referenzgene (60 kHz)..... | 65 |
| 3.3.2.2 Messung der Referenzgene (488 kHz und 3 MHz) und Ischämieproben..... | 69 |
| 3.3.2.3 Genexpression nach fokaler Ischämie und Ultraschallbehandlung..... | 69 |
| 3.4 Genexpressionsmessung mittels Mikroarray..... | 90 |
| 3.4.1 Versuchsaufbau..... | 90 |
| 3.4.2 Ziel der Studie..... | 90 |
| 3.4.2.1 Ergebnisse der Operon-Mikroarray-Versuche..... | 90 |
| 3.4.2.2 Ergebnis der Affymetrix-Mikroarrays..... | 90 |
| 3.4.2.2.1 Eingruppierung der regulierten Gene..... | 92 |
| 3.5 Selektion von Kandidatengen aus den Mikroarray-Daten..... | 95 |
| 3.5.1 Versuchsaufbau..... | 95 |
| 3.5.2 Ziel der Studie..... | 95 |
| 3.5.3 qPCR-Verifizierung..... | 95 |
| 3.5.3.1 Genexpression nach fokaler Ischämie und Ultraschallbehandlung..... | 96 |
| 3.6 Ausschlusskriterien für die Experimente..... | 99 |
| 3.6.1 Ultraschallstudien..... | 99 |
| 3.6.2 Genexpressionsmessungen..... | 99 |
| 4 Diskussion:..... | 100 |
| 4.1 60 kHz Ultraschall vergrößert das Ischämievolumen im Reperfusionmodell und führt zu einer Hörschädigung bei Ratten..... | 100 |
| 4.1.1 Auswirkungen der Ultraschallbehandlung auf das neurologische Ergebnis, das Hörvermögen und die Mortalität..... | 100 |
| 4.1.2 Vergrößerung der Läsion durch die Ultraschallbehandlung..... | 101 |
| 4.1.3 Effiziente intrakranielle Temperaturkontrolle durch Verwendung eines Ultraschall-Intervallschemas..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.4 Zusammenfassung und Ausblick..... | 103 |
| 4.2 Eine Schädigung ischämischen Gehirngewebes durch 60 kHz Ultraschall ist abhängig vom Duty Cycle..... | 103 |
| 4.2.1 Neurologische Beurteilung und Hörminderung nach Ultraschallbehandlung..... | 104 |
| 4.2.2 Läsionsentwicklung nach Ultraschallbehandlung und histologische Auswertung. . | 105 |
| 4.2.3 Zusammenfassung und Ausblick..... | 106 |
| 4.3 Differenzielle Genexpression nach Anwendung verschiedener Ultraschallsonden – Zahlreiche Effekte bei 488 kHz nachweisbar..... | 107 |
| 4.3.1 Messung der Genexpression bei fokaler, zerebraler Ischämie: Vergleich mit Literaturdaten..... | 107 |
| 4.3.2 Die Ultraschallwirkung auf die Genexpression ist frequenzabhängig..... | 115 |
| 4.3.2.1 Wirkung von Ultraschall auf die Apoptose – teilweise ähnliche Muster wie nach einer Ischämie..... | 116 |
| 4.3.2.2 488 kHz Ultraschall zur Stärkung der Angiogenese?!..... | 118 |
| 4.3.2.3 Auch 60 kHz Ultraschall verursacht keine Stressreaktion..... | 119 |
| 4.3.2.4 Neuronale NOS (nNOS) wird nach allen Ultraschallbehandlungen hochreguliert | 120 |
| 4.3.2.5 Kein oxidativer Stress durch Ultraschall – aber was ist mit den Globinen?!... .. | 120 |
| 4.3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick..... | 121 |
| 4.4 Mikroarrays im Vergleich..... | 123 |
| 4.4.1 Der Affymetrix-Chip zeigt nur geringe, differentielle Genregulationen..... | 123 |
| 4.4.2 Daten von Mikroarrays und qPCR sind nicht vergleichbar..... | 124 |
| 5 Zusammenfassung..... | 125 |
| 6 Summary..... | 126 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 127 |
| 8 Versicherung..... | 140 |
| 9 Lebenslauf..... | 141 |
| 10 Veröffentlichungen..... | 145 |
| 11 Digitaler Anhang..... | 157 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1: Entwicklung der Penumbra nach ischämischem Ereignis..... | 5 |
| Abbildung 1-2: Die postischämische Kaskade..... | 6 |
| Abbildung 1-3: Pathophysiologische Vorgänge in der Zelle nach ischämischem Infarkt..... | 7 |
| Abbildung 1-4: Grafische Darstellung des Duty Cycles..... | 12 |
| Abbildung 1-5: Ultraschallthrombolyse in der Literatur (1974-2008)..... | 14 |
| Abbildung 2-1: Ventralansicht des Gehirns mit Nylon-Okkluder..... | 22 |
| Abbildung 2-2: Setup mit der 60 kHz und 3 MHz Sonde..... | 23 |
| Abbildung 2-3: Sondenplatzierung der 488 kHz-Sonde..... | 24 |
| Abbildung 2-4: Ratte in der Halterung am MRT..... | 26 |
| Abbildung 2-5: Magnetresonanztomograph Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T..... | 26 |
| Abbildung 2-6: Protokoll der neurologischen Bewertungen..... | 30 |
| Abbildung 2-7: TTC-Färbung eines ischämischen Gehirns..... | 31 |
| Abbildung 2-8: Formel zur Berechnung des ödemkorrigierten Läsionsvolumens..... | 32 |
| Abbildung 2-9: Ultraschallgerät 60 kHz der Firma Bandelin, Berlin..... | 34 |
| Abbildung 2-10: Schallgeber und Ultraschallgerät 488 kHz-Sonde, Furuhata/Tokyo/Japan..... | 34 |
| Abbildung 2-11: Farbduplex Ultraschallgerät mit einer Frequenz von 3 MHz..... | 35 |
| Abbildung 2-12: Screenshot von NanoDrop Messung..... | 36 |
| Abbildung 2-13: RNA Gel..... | 37 |
| Abbildung 2-14: ABI Detection System 7000 und 7500 FAST..... | 42 |
| Abbildung 2-15: Amplifikationsplot..... | 44 |
| Abbildung 2-16: Standardgerade eines qRT-PCR-Laufs..... | 45 |
| Abbildung 3-1: Neurologische Beurteilung nach 24 h..... | 57 |
| Abbildung 3-2: Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Hörfähigkeit..... | 57 |
| Abbildung 3-3: ödemkorrigiertes Läsionsvolumen ermittelt durch MRT-Messung..... | 57 |
| Abbildung 3-4: Mortalitätsrate der Versuchsgruppen..... | 57 |
| Abbildung 3-5: Kranielles Temperaturprofil verschiedener Schallmodi..... | 57 |
| Abbildung 3-6: Zerebrale Blutungen und subarachnoidale Blutungen..... | 59 |
| Abbildung 3-7: Repräsentative, immunhistochemische Färbungen verschiedener Schnitte..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3-8: Versuchsablauf Duty Cycle Studie..... | 60 |
| Abbildung 3-9: Neurologische Beurteilung der Versuchstiere..... | 65 |
| Abbildung 3-10: Einzelauswertung des Hörvermögens aus der neurologischen Beurteilung..... | 65 |
| Abbildung 3-11: Histologische Auswertung nach TTC-Färbung..... | 65 |
| Abbildung 3-12: SAB-Neigung nach Ultraschallbehandlung..... | 65 |
| Abbildung 3-13: Mortalität der Tiere während des Experiments..... | 65 |
| Abbildung 3-14: Hörschwellenbestimmung beschallter und unbehandelter Tiere nach 24 h..... | 65 |
| Abbildung 3-15: HE-Färbung eines Gehirns mit SAB..... | 65 |
| Abbildung 3-16: Expression des Referenzgens β -aktin..... | 69 |
| Abbildung 3-17: Expression des Referenzgens ARP..... | 69 |
| Abbildung 3-18: Expression des Referenzgens Albumin..... | 69 |
| Abbildung 3-19: Expression des Referenzgens Cyclophilin A..... | 69 |
| Abbildung 3-20: Expression des Referenzgens Gapdh..... | 69 |
| Abbildung 3-21: Mittlere Stabilität der gemessenen Referenzgene..... | 70 |
| Abbildung 3-22: Bestimmung der Anzahl von Referenzgenen..... | 70 |
| Abbildung 3-23: Expression von Caspase 9 nach induzierter Ischämie..... | 75 |
| Abbildung 3-24: Expression von Caspase 3 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 75 |
| Abbildung 3-25: Expression von Caspase 9 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 75 |
| Abbildung 3-26: Expression von Akt1 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 75 |
| Abbildung 3-27: Expression von Akt2 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 75 |
| Abbildung 3-28: Expression von Akt3 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 75 |
| Abbildung 3-29: Expression von Bcl2 nach induzierter Ischämie..... | 77 |
| Abbildung 3-30: Expression von Bcl2 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 77 |
| Abbildung 3-31: Expression von AiF nach induzierter Ischämie..... | 77 |
| Abbildung 3-32: Expression von AiF nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 77 |
| Abbildung 3-33: Expression von VEGF nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 81 |
| Abbildung 3-34: Expression von Egr1 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 81 |
| Abbildung 3-35: Expression von Egr2 nach induzierter Ischämie..... | 81 |
| Abbildung 3-36: Expression von Egr2 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 81 |
| Abbildung 3-37: Expression von EFNA nach induzierter Ischämie..... | 81 |
| Abbildung 3-38: Expression von EFNA nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 81 |
| Abbildung 3-39: Expression von Ang01 nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 82 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 3-40: Expression von Ang02 nach induzierter Ischämie..... | 82 |
| Abbildung 3-41: Expression von Hsp27 nach induzierter Ischämie..... | 84 |
| Abbildung 3-42: Expression von Hsp70 nach induzierter Ischämie..... | 84 |
| Abbildung 3-43: Expression von Jun nach induzierter Ischämie..... | 84 |
| Abbildung 3-44: Expression der nNOS nach induzierter Ischämie..... | 87 |
| Abbildung 3-45: Expression der nNOS nach 60 kHz Ultraschallbehandlung..... | 87 |
| Abbildung 3-46: Expression der nNOS nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 87 |
| Abbildung 3-47: Expression der iNOS nach induzierter Ischämie..... | 87 |
| Abbildung 3-48: Expression der eNOS nach induzierter Ischämie..... | 87 |
| Abbildung 3-49: Expression von Nrf2 nach induzierter Ischämie..... | 91 |
| Abbildung 3-50: Expression der SOD-1 nach induzierter Ischämie..... | 91 |
| Abbildung 3-51: Expression der SOD-2 nach induzierter Ischämie..... | 91 |
| Abbildung 3-52: Expression der Hmox nach induzierter Ischämie..... | 91 |
| Abbildung 3-53: Expression der Ngb nach induzierter Ischämie..... | 91 |
| Abbildung 3-54: Expression von Cygb nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)..... | 91 |
| Abbildung 3-55: Anzahl der Genregulationen nach 60 kHz Ultraschallbehandlung..... | 94 |
| Abbildung 3-56: Funktionelle Einteilung der Genexpression (4 h)..... | 95 |
| Abbildung 3-57: Funktionelle Einteilung der Geneexpression (24 h)..... | 95 |
| Abbildung 3-58: Igf2 Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen..... | 101 |
| Abbildung 3-59: Igf2-UTR Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen..... | 101 |
| Abbildung 3-60: Igfbp2 Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen..... | 101 |
| Abbildung 3-61: Il6ra Expression 24 h nach unterschiedlichen Behandlungen..... | 101 |
| Abbildung 3-62: JunD Expression 24 h nach unterschiedlichen Behandlungen..... | 101 |
| Abbildung 4-1: Der Apoptosesignalweg und gemessene Veränderungen der Genexpression nach Anwendung der 488 kHz Sonde..... | 120 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1-1: Kandidatengene aus der Literaturrecherche | 18 |
| Tabelle 2-1: PCR-Programm..... | 38 |
| Tabelle 2-2: Unterschiede in der Verwendung von Materialien..... | 42 |
| Tabelle 2-3: Protokolle für die verschiedenen Sequenz Detektion Systeme..... | 42 |
| Tabelle 2-4: qRT-PCR Programm..... | 43 |
| Tabelle 2-5: Durchgeführte Versuche mit den Operon Chips..... | 48 |
| Tabelle 2-6: Qualitätskontrolle mit Software GenePix..... | 49 |
| Tabelle 3-1: Gruppeneinteilung der 60 kHz Studie..... | 53 |
| Tabelle 3-2: Gruppeneinteilung der Duty Cycle-Studie..... | 60 |
| Tabelle 3-3: Gruppeneinteilung HNO Studie..... | 61 |
| Tabelle 3-4: Gruppeneinteilung Genexpressionsstudie..... | 66 |
| Tabelle 4-1: Genregulationen nach ischämischen Ereignis..... | 110 |
| Tabelle 4-2: Differentielle Genregulation nach verschiedenen Ultraschallbehandlungen..... | 117 |
| Tabelle 4-3: Übersicht Vergleich Mikroarray und qPCR-Daten der selektierten Kandidatengene | 126 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---------------|--|
| <i>ACC</i> | <i>Arteria carotis communis, engl. CCA</i> |
| <i>ACE</i> | <i>Arteria cartotis externa, engl. ECA</i> |
| <i>ACI</i> | <i>Arteria carotis interna, engl. ICA</i> |
| <i>ACM</i> | <i>Arteria cerebri media, engl. MCA</i> |
| AEP | Akustisch, evozierte Potentiale |
| <i>AiF</i> | engl. Apoptosis Inducing Factor |
| <i>Akt</i> | auch als Proteinkinase B, PKB bezeichnet |
| <i>Ang</i> | Angiopoietin |
| <i>Arp</i> | engl. Acidic ribosomal phosphoprotein |
| <i>bcl-2</i> | engl. B-cell- lymphoma |
| <i>Casp</i> | Caspase |
| cDNA | engl. complementary DNA |
| CT | Computertomografie |
| Cw | engl. Continuous Wave |
| <i>Cygb</i> | Cytoglobin |
| <i>EFNA5</i> | Ephrin-5 |
| <i>Egfr</i> | engl. Epidermal Growth Factor Receptor |
| <i>eNOS</i> | endotheliale NO-Synthase |
| <i>Egr1</i> | engl. Early Growth Response |
| <i>Fgf2</i> | engl. Fibroblast Growth Factor |
| <i>GAP-DH</i> | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase |
| HE | Hämatoxilin-Eosin-Färbung |
| <i>Hmox</i> | Hämoxygenase |
| <i>Hsp</i> | engl. Heat Shock Protein |
| Hz | Hertz |
| i.p. | lat. intraperitoneal |
| Igf | engl. Insulin-like growth factor |
| <i>IL</i> | Interleukin |
| <i>iNOS</i> | induzierbare NO-Synthase |
| kHz | Kilohertz |

| | |
|--------------------------------|---|
| MHz | Megahertz |
| Abkürzung | Bedeutung |
| MRT | Magnetresonanztomografie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| <i>Ngb</i> | Neuroglobin |
| <i>nNOS</i> | neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| <i>Nrf2</i> | engl. nuclear factor– erythroid 2–related factor |
| NTC | engl. No Template Control |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| QPCR | quantitative Real-Time RT-PCR |
| Rep | Reperfusion |
| rt-PA | engl. recombinant tissue-type plasminogen activator, auch Alteplase genannt |
| <i>SOD</i> | Superoxid-Dismutase |
| <i>TNF-α</i> | engl tumor necrosis factor |
| TTC | 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid |
| US | Ultraschall |
| UTR | engl. Untranslated Region |
| <i>VEGF</i> | engl. Vascular Endothelial Growth Factor |

1 Einleitung:

1.1 *Der Schlaganfall*

Als zerebrale Ischämie bezeichnet man eine Minderdurchblutung des Gehirns in Folge des Verschlusses eines Hirngefäßes. 80-85% der Patienten erleiden einen solchen ischämischen Schlaganfall, wohingegen bei 15-20% eine intrazerebrale Blutung, Subarachnoidalblutung oder Sinusthrombose Grund für einen Schlaganfall sind. Pro Jahr sind ca. 200.000 Menschen in Deutschland durch einen Schlaganfall betroffen. Von diesen Patienten sterben 15-20% innerhalb der ersten vier Wochen. Die Patienten, die einen Schlaganfall überleben, tragen häufig schwere Behinderungen davon, so dass oft ein eigenständiges Leben nicht mehr möglich ist (Poeck, 2006). Risikofaktoren sind vor allem die allgemeinen Gefäßrisikofaktoren wie Bluthochdruck, kardiale Krankheiten, Karotisstenosen (Gefäßengstellung), Fettstoffwechselstörungen, Gerinnungsstörungen, Diabetes, Rauchen, Alkohol, Migräne und Bewegungsmangel. Ebenso erhöhen Infektionen und Übergewicht deutlich das Risiko, an einem Schlaganfall zu erkranken. Als nicht beeinflussbare Risikofaktoren gelten das Alter, Geschlecht und eine genetische Prädisposition (Poeck, 2006).

Wird ein Patient mit Verdacht auf einen Schlaganfall ins Krankenhaus eingeliefert, muss eine Diagnose zeitnah erfolgen, da mit fortschreitender Zeit ohne spezifische Therapie die Chance auf vollständige Genesung sinkt. Typische Symptome stellen halbseitige Lähmungen (Hemiparesen), Verlust des Sprachverständnisses oder der Sprache dar. Besondere Bedeutung neben der klinischen Diagnose haben bildgebende Verfahren. Mit Hilfe der Computertomografie (CT) kann der Infarkt erst nach einigen Stunden verlässlich sichtbar gemacht werden. Eine Blutung lässt sich jedoch frühzeitig ausschließen, was vor dem Hintergrund der spezifischen Behandlungsmöglichkeiten des ischämischen Infarktes besonders wichtig ist. Eine CT-Angiografie kann die Hirngefäße grafisch darstellen, so dass eine 3D-Darstellung der intra- und extrakraniellen Gefäße möglich wird (Masuhr *et al.*, 2005). Eine weitere diagnostische Methode ist die Magnetresonanztomografie (MRT) (Prichard *et al.*, 1999). Eine hochauflösende Darstellung der Gefäße (Angiografie) und des Hirngewebes ist mit dieser Methode ebenso möglich, wie das Messen des Wassergehalts (Ödembestimmung). Zur hämodynamischen Beurteilung der extra- und intrakraniellen Arterien wird der Ultraschall verwendet. Mit der Doppler- und Duplexsonografie lassen sich Stenosen und Verschlüsse in der Akutphase des Schlaganfalls mit hoher Sicherheit darstellen (Gerriets *et al.*, 2000; Goertler *et al.*, 2002).

In den letzten Jahren kam es aufgrund von verbesserten hygienischen Bedingungen, Ernährung und medizinischer Versorgung zu einem Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung. So lag zu Anfang des 20. Jahrhunderts die durchschnittliche Lebenserwartung noch bei 51 Jahren (Frauen) und 47 Jahren (Männer) und liegt mittlerweile bei 82 bzw. 76 Jahren (Abbildung 1-1). Des Weiteren werden die Menschen nicht nur älter, sondern auch dicker, so dass ein weiterer Risikofaktor, an einem Schlaganfall zu erkranken, steigt (Statistisches Bundesamt, 2006). Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung des zerebrovaskulären Systems.

1.2 Therapie des Schlaganfalls

Eine spezifische Therapie muss darauf abzielen, die zerebrale Perfusion zu verbessern. Hier ist als einzige zugelassene Behandlung die Thrombolyse zu nennen, also eine Rekanalisationstherapie mit rt-PA (engl. recombinant tissue-type plasminogen activator). Eine intraarterielle Behandlung mit Thrombolytika kann innerhalb von 6 h erfolgversprechend durchgeführt werden (Furlan *et al.*, 1999). Systemisch (intravenös) ist die Gabe von rt-PA innerhalb von 4,5 h als wirksam nachgewiesen (Hacke *et al.*, 2004; NINDS, 1995). Hierdurch kann die Wahrscheinlichkeit einer bleibenden Behinderung in Folge des Schlaganfalls gesenkt werden. Allerdings ist die Rekanalisationsrate auch nach Gabe von rt-PA inkomplett und die Zahl der Patienten mit bleibenden Behinderungen nach wie vor hoch. Im Mittel müssen sieben Patienten mit dem Medikament behandelt werden, um einem Patienten zusätzlich ein unabhängiges Leben nach dem Schlaganfall zu ermöglichen. Hinzu kommt, dass ein Einfluss von rt-PA auf die Mortalität bislang nicht gezeigt werden konnte. Auch führen das begrenzte Zeitfenster und die verschiedenen Kontraindikationen dazu, dass nur ein Teil der Patienten behandelt werden kann. Wichtige Kontraindikationen sind das Vorhandensein einer Blutung, ein Alter über 80 Jahre, größere operative Eingriffe im vorangegangenen Monat oder eine Gerinnungsstörung.

Aufgrund dieser Begrenztheit der vorhandenen Therapiemöglichkeiten kommt der Schlaganfallforschung, auch der experimentellen Schlaganfall Forschung, ein großer Stellenwert zu. Insbesondere hat die Weiterentwicklung der rekanalisierenden Therapieoptionen für die Akutbehandlung eine große Bedeutung. Vor diesem Hintergrund ist das in dieser Arbeit behandelte Therapieverfahren, die Sonothrombolyse, als eine zusätzliche Option zu sehen.

1.3 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Die meisten Erkenntnisse zur Pathophysiologie des Schlaganfalls stammen aus tierexperimentellen Studien. Diese Daten sind für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen sehr wertvoll, da aus diesen Informationen Ideen für neuartige Therapieformen gewonnen werden können. Ein genaues Verständnis der Vorgänge ist daher unerlässlich. In diesem Abschnitt werden das Penumbra-Konzept sowie die Abläufe der postischämischen Kaskade vorgestellt. Das Penumbra-Konzept stellt die Grundlage für die Notwendigkeit einer rekanalisierenden Therapie beim akuten zerebralen Gefäßverschluss dar. Das Verständnis der postischämischen Kaskade ist für den molekular-genetischen Teil dieser Arbeit von Bedeutung.

1.3.1 Die Penumbra

Als Penumbra bezeichnet man das vulnerable Gewebe um einen ischämischen Kern (Abb. 1-2). In einem solchen Kern kommt es bereits kurz nach Eintreten der Ischämie zu einem irreversiblen Zelluntergang. Als Penumbra (lat. Halbschatten) wird das Gebiet rund um einen solchen Kern bezeichnet. Dieses Gebiet wird durch eine Restperfusion z.B. über Kollateralen noch mit Sauerstoff und Glukose versorgt, ist allerdings in der Funktion bereits beeinträchtigt und vital bedroht. Durch zahlreiche Prozesse, zu denen Entzündungsreaktionen, Exzitotoxizität oder „Spreading Depolarisations“ gehören, kann dieses Gebiet so geschädigt werden, dass es auch hier zum irreversiblen Nervenzellverlust kommt, was folglich zu einer Vergrößerung des ischämischen Areals führt (Ginsberg, 2003). Der Schutz der Penumbra durch frühzeitige Rekanalisation oder durch Neuroprotektion ist ein wichtiges Ziel der Schlaganfallforschung.

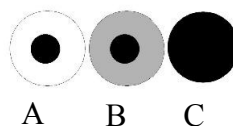


Abbildung 1-1: Entwicklung der Penumbra nach ischämischem Ereignis

Nach einem ischämischen Ereignis bildet sich schnell ein nekrotischer Kern (A, B schwarz). Das Gewebe um diesen Kern wird zur Penumbra (B, grau), die noch nicht nekrotisch ist, sich aufgrund der Minderperfusion jedoch in einem vital gefährdeten Zustand befindet. Kann die Perfusion nicht rechtzeitig wiederhergestellt werden, wird sich die Penumbra zunehmend in nekrotisches Gewebe umwandeln (C). (eigene Darstellung, nach Walberer, 2005)

1.3.2 Die postischämische Kaskade

Nach einer fokalen Ischämie laufen zeitlich versetzt pathophysiologische Prozesse ab (Abb. 1-4).

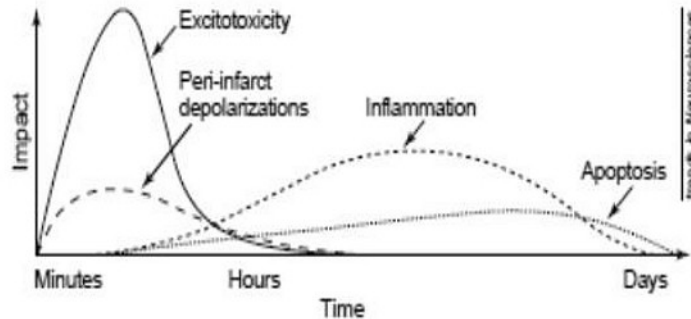


Abbildung 1-2: Die postischämische Kaskade

Wie in der Abbildung dargestellt, kommt es zeitabhängig nach eingetretener Ischämie zu verschiedenen schädlichen Abläufen. Bereits nach wenigen Minuten steigt die Exzitotoxizität und die Periinfarktdepolarisierung an. Erst nach einigen Stunden beginnen Prozesse wie Inflammation und Apoptose (Dirnagl *et al.*, 1999).

Früh nach einem ischämischen Ereignis (bis ein paar Stunden nach einem Schlaganfall) treten hauptsächlich exzitotoxische und depolarisierende Prozesse auf. Erst nach ein paar Stunden kommt es zu einer Inflammation (Entzündung) und Apoptose (programmierter Zelltod) (Dirnagl *et al.*, 1999).

Exzitotoxizität und Periinfarktdepolarisation

Nach einer Ischämie kommt es zu einer Depolarisation, da die Sauerstoff- und Glukoseversorgung unterbrochen ist. Das Gehirn ist ausschließlich auf den Energiegewinn durch Verwertung von Glukose angewiesen. Daher können energetisch aufwendige Prozesse wie das Betreiben von Ionenpumpen (Natrium/Kalium) nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es kommt zu einem Zusammenbruch der Membranspannung, die Pumpen öffnen sich (siehe Abb. 1-3) (Block *et al.*, 1999). Unter dem Begriff Exzitotoxizität versteht man die Anreicherung von exzitatorischen Aminosäuren im extrazellulären Raum. Dies geschieht durch die Depolarisation der Neuronen und Gliazellen (Nedergaard *et al.*, 2005), so dass sich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und Aminosäuren in den extrazellulären Raum freigesetzt werden können. Zusätzlich wird die Aufnahme von Aminosäuretransmittern gestört, wodurch die extrazelluläre Anreicherung von Glutamat gefördert wird (Siegenthaler *et al.*, 2006). Der Anstieg von Glutamat nach einer Ischämie bleibt noch einige Zeit bestehen, wie in tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte (Osuga *et al.*, 1994). Glutamat wiederum wirkt auf verschiedene Rezeptortypen: NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren, AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-

Porpionsäure)-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren. Bei diesen handelt es sich um Rezeptoren, welche den Einstrom verschiedener Ionen regulieren (Kalzium, Natrium und Kalium) und somit das Membranpotential der Zelle regulieren (siehe Abb. 1-3) (Dirnagl *et al.*, 1999; Monaghan *et al.*, 1989; Siegenthaler *et al.*, 2006). Eine Repolarisierung der Zellen ist in der Penumbra möglich, insofern diese wieder mit Energie versorgt wird (Hossmann, 1996).

Zeitgleich treten auf der kontralateralen (gegenüberliegenden) Seite zur Ischämie sogenannte „Spreading Depressions“ auf. Dies wurde erstmals in Experimenten *in vivo* entdeckt. Gemeint ist damit eine gesteigerte Neuronenaktivität und folglich auch ein gesteigerter Metabolismus. Daher kann es in Folge dieser „Spreading Depressions“ dazu kommen, dass Penumbragewebe irreversibel geschädigt wird, da es den nötigen Energiehaushalt nicht decken kann (Back *et al.*, 1994; Hamann, 1997; Nedergaard, 1988). Neue Arbeiten legen nahe, dass es auch nach humanem Schlaganfall zu „Spreading Depressions“-Ereignissen kommt (Dohmen *et al.*, 2008).

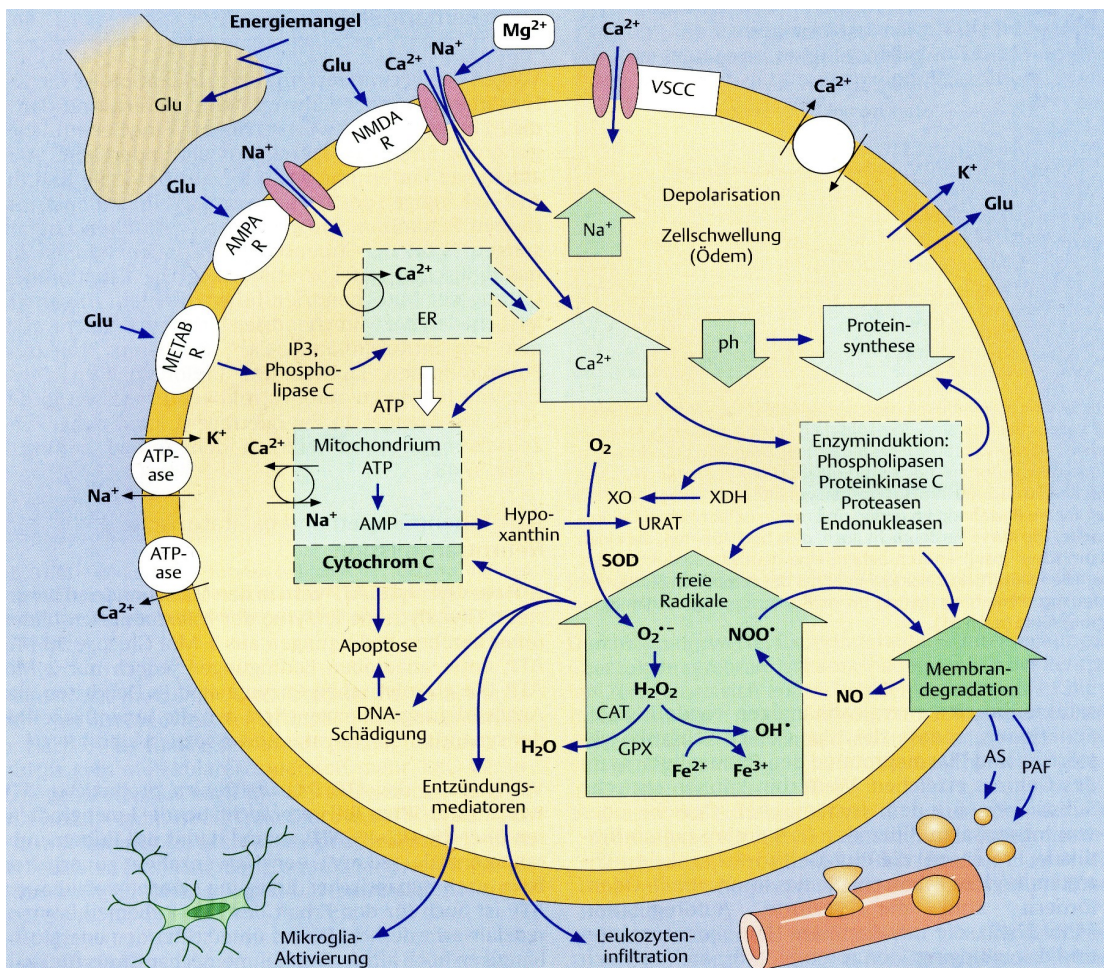


Abbildung 1-3: Pathophysiologische Vorgänge in der Zelle nach ischämischem Infarkt

Die pathophysiologischen Vorgänge nach einer Ischämie laufen nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich getrennt voneinander ab. Der Beginn ist die Ausschüttung von Glutamat und die damit verbundene Änderung des Membranpotentials und die Unterbrechung der Energie- und Sauerstoffversorgung (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Entstehung freier Radikale

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die über ein ungepaartes (freies) Elektron und somit über eine erhöhte Reaktivität verfügen. Diese Moleküle binden unspezifisch an alle Protonendonatoren. Diese hohe Reaktivität macht solche Teilchen im Organismus schädlich, da das empfindliche Gleichgewicht physiologischer Prozesse schnell und nachhaltig gestört werden kann (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Nach erfolgter Ischämie kommt es zu einer Freisetzung von Kalzium. Dieses aktiviert wiederum andere Moleküle wie Phospholipasen und Cyclooxygenasen, die wiederum freie Radikale bilden können. Ein entscheidendes Enzym hierbei ist die neuronale NO-Synthase, welche Stickstoffoxid (NO) mit Superoxid-Anionen koppelt. Das dabei entstehende Peroxynitrit (NOO•) ist ein hoch reaktives Radikal. Vor allem Sauerstoffradikale sind nach zerebraler Ischämie im Gewebe weit verbreitet. Diese oxidieren beispielsweise Proteine der Elektronentransportkette, so dass eine Umsetzung von Energie an der Mitochondrienmatrix nicht mehr möglich ist. Durch eine solche Störung können wiederum Cytochrom C und andere pro-apoptotische Faktoren ins Zytoplasma freigesetzt werden (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Vor allem nach erfolgter Reperfusion des Gewebes kann es zur Bildung von Sauerstoffradikalen kommen. Das geschädigte Gewebe ist mit der Verarbeitung des Sauerstoffs überfordert. Die endogenen Schutzmechanismen der Zelle reichen nicht aus, den Schaden zu kompensieren und es kommt zur Oxidation von DNA, Lipiden und zur Schädigung der Zellmembran. Nicht nur Apoptose, sondern auch inflammatorische Prozesse werden somit in Gang gesetzt (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Inflammation

Bereits ein paar Stunden nach aufgetretener Ischämie kommt es zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion im Gewebe (siehe Abb. 1-2). Diese macht sich vornehmlich durch eine mikrovaskuläre Veränderung bemerkbar, bei der adhesive Moleküle inflammatorische Zellen aktivieren, die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke fördern und somit den inflammatorischen Prozess unterstützen (Arvin *et al.*, 1996; Hamann, 1997). Des Weiteren sind Faktoren wie TNF- α (engl. tumour necrosis factor-alpha) und Vertreter der Interleukin-Familie in den inflammatorischen Prozess involviert. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass TNF- α einen Einfluss auf das Endothel hat und folglich das Gehirn vor nachfolgender Schädigung bewahren kann. Außerdem war es möglich darzustellen, dass im Vergleich zu normotensiven Ratten bei spontan hypertensiven Tieren (SHT-Ratten) ein höherer TNF- α -Level vorliegt,

welcher möglicherweise mit einem vergrößerten Infarkt volumen korreliert (Arvin *et al.*, 1996; Sirén *et al.*, 1992). Das proinflammatorische Zytokin, Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein Polypeptid, dass nach Infektionen oder Verletzungen gebildet wird (Dinarello, 1992). Durch die Blockade von IL-1 β konnte in einer Studie ein protektiver Effekt nachgewiesen werden (Rothwell *et al.*, 1993). Als weiterer Vertreter der Interleukin-Familie ist das Interleukin-6 (IL-6) zu nennen. Allerdings fand man heraus, dass IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist (Balasingam *et al.*, 1994). Genau wie bei TNF- α und IL-1 β ist auch IL-6 nach fokaler Ischämie hochreguliert (Arvin *et al.*, 1996).

Ein weiterer Inflammationsmarker ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Diese ist nur unter pathologischen Bedingungen exprimiert, da aktivierte Entzündungszellen NO bilden und freisetzen (Nathan *et al.*, 1994). NO wirkt als Transmitter auf die Glutamatempfindlichkeit, so dass der Effekt des Glutamats verstärkt wird (Dalkara *et al.*, 1997).

Apoptose

Wie bei der Inflammation ist auch die Apoptose (programmierter Zelltod) bereits wenige Stunden nach einem ischämischen Ereignis nachweisbar (über die Freisetzung von *Cytochrom C* und *caspase 3*). Allerdings kommt es erst nach wenigen Tagen nach einem ischämischen Ereignis zu einer deutlichen Ausprägung der Apoptose (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Die Ausbildung einer Apoptose wird durch verschiedene Faktoren gesteuert. Es gibt pro-apoptotische (z.B. *caspasen* und *TNF- α*) und anti-apoptotische Faktoren (z.B. *bcl-2*, *Akt 1-3*). Je nachdem welche Faktoren überwiegen, entscheidet sich das Schicksal der Zelle (Siegenthaler *et al.*, 2006). Die oben genannten Faktoren können auf unterschiedlichen Wegen wirken. So gibt es die intrinsische und die extrinsische Apoptosekaskade. Die intrinsische Apoptosekaskade läuft innerhalb des Zelllumens ab und wird verursacht durch eine mitochondriale Fehlfunktion. Die extrinsische Apoptosekaskade hingegen ist Rezeptor-vermittelt, wird extrazellulär initiiert und intrazellulär weitergeleitet (Padosch *et al.*, 2001).

Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen. Vor allem in der Tumorforschung spielen Angiogenesefaktoren eine essentielle Rolle, da diese von Tumoren gebildet werden und zur Ausbreitung von Tumoren beitragen (Folkman *et al.*, 1992). Wird die Angiogenese hingegen gehemmt, so kann das Tumorstadium inhibiert werden (Jain, 2001). Nach einem ischämischen Ereignis ist der periphere Blutfluss von großer Wichtigkeit, da dieser die Penumbra mit Sauerstoff und Glukose versorgt und somit vor dem Untergang bewahrt

(Hayashi *et al.*, 2003). In tierexperimentellen Studien konnte dies belegt werden. Nach erfolgter Ischämie wurde detektiert, dass sich der Durchmesser und die Länge der Kollateralen änderte und somit zu einer verbesserten Perfusion führte (Wei *et al.*, 2001). Eine klinische Studie von Krupinski konnte belegen, dass die Zunahme von Blutgefäßen mit einem längeren Überleben korreliert (Krupinski *et al.*, 1994). Des Weiteren konnte in einer experimentellen Studie gezeigt werden, dass nach einem Infarkt in der umgebenen Region neue Gefäße gebildet werden (Weiller *et al.*, 1993).

Nichts desto trotz gibt es auch sich widersprechende Studien. Die einen belegen die positiven Effekte von z.B. VEGF (Harrigan *et al.*, 2002), andere hingegen konnten inhibierende Effekte auf die Angiogenese des gleichen Faktors nachweisen (Zhang *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei den Apoptose-Faktoren muss daher stets das Zusammenspiel der Einzelfaktoren betrachtet werden, um ein vollständiges Bild zu erhalten.

1.4 Versuchstiere in der Schlaganfallforschung

In der Schlaganfallforschung werden verschiedene Spezies eingesetzt. Angefangen von Maus (*Mus musculus*), Gerbil (*Meriones unguiculatus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) über Katzen (*Felis silvestris f. catus*), Hunde (*Canis lupus familiaris*), Schafe (*Ovis orientalis aries*), Schweine (*Sus scrofa domestica*) oder Primaten. Die Wahl des Modellorganismus kann verschiedene Gründe haben. Die Handhabung von Nagern ist weitaus einfacher und finanziell günstiger. Neben diesem Vorteil weisen die kleinen Nager in der Anatomie der hirnversorgenden Gefäße eine große Ähnlichkeit zu höher gestellten Säugetieren auf. Durch jahrzehntelange Zucht ist es gelungen, genetisch homogene Tiere zu züchten. Außerdem ist es möglich, bei Mäusen Gene spezifisch an (knock-in) oder auszuschalten (knock-out).

Ein weiterer Grund für die Wahl kleinerer Modellorganismen ist die ethische Akzeptanz (Ginsberg *et al.*, 1989). Aus den genannten Gründen wurden die tierexperimentellen Versuche dieser Arbeit an Ratten durchgeführt.

1.5 Die Schlaganfallmodelle an der Ratte

In der experimentellen Schlaganfallforschung werden verschiedene Tiermodelle verwendet. Ein häufiges Modell ist das sogenannte Fadenmodell, in dem mit einem beschichteten Nylonfaden die *Arteria cerebri media* (ACM) verschlossen wird. Daneben gibt es embolische ACM-Verschlussmodelle, in denen entweder Blutgerinnsel (Thrombembolienmodelle) oder Titanoxyd- bzw. Keramikkügelchen zur Induktion einer zerebralen Ischämie injiziert werden. Das Fadenmodell wurde in dieser Arbeit verwendet und soll daher nachfolgend erläutert werden.

1.5.1 Das Fadenmodell

Erstmals wurde das Fadenmodell 1986 von einer japanischen Arbeitsgruppe beschrieben (Koizumi, J., Y. Yoshida, Nakazawa, G. Ooneda, 1986). Bei diesem Modell wird ein Nylonfaden über eine Arteriotomie ins Lumen der *Arteria carotis communis* (ACC) eingeführt und bis zur Bifurkation (Aufteilung) der *Arteria cerebri media* (ACM) und *Arteria cerebri anterior* vorgeschoben, wodurch die ACM verlegt wird. Mittlerweile haben sich vielfältige Varianten des Modells entwickelt (Belayev *et al.*, 1996; Longa *et al.*, 1989; Shimamura *et al.*, 2006). Das Modell ist einfach durchzuführen und überzeugt durch seine hohe Reproduzierbarkeit. Es sind allerdings einige Nebenwirkungen bekannt, die es zu vermeiden gilt. Zu diesen Nebenwirkungen gehört beispielsweise das Auftreten von subarachnoidalen Blutungen (Kuge *et al.*, 1995; Laing *et al.*, 1993). Hierbei wird durch die Spitze des Fadens ein Gefäß perforiert. Des Weiteren kann bei unzureichender Eindringtiefe des Fadens die Verlegung der ACM ausbleiben und es zu einem unzureichenden Verschluss kommen (Laing *et al.*, 1993). Durch Bewegungen des Tieres in der postoperativen Phase kann es zur Dislokation des Okkluders kommen, was wiederum zu einer unvollständigen Okklusion führt (Schmid-Elsaesser *et al.*, 1998). Das Fadenmodell kann als permanentes oder als Reperfusion-Verschlussmodell genutzt werden. Eine Reperfusion des Gewebes kann erreicht werden, indem der Faden nach einer definierten Zeit wieder aus dem Gefäß entfernt wird.

1.6 Therapeutischer Ultraschall beim Schlaganfall (Sonothrombolyse)

Über die Entwicklung der Sonothrombolyse ergibt sich die Möglichkeit einer Erweiterung der Therapiemodalitäten beim akuten zerebralen Gefäßverschluss. Erste Arbeiten zu diesem Thema wurden in den 70er Jahren veröffentlicht (Trübestein *et al.*, 1976), erste neurologische Arbeiten erschienen vor wenigen Jahren (Behrens *et al.*, 1999; Nedelmann *et al.*, 2002b). Inzwischen wurden eine Reihe klinisch-neurologischer und experimenteller Arbeiten zur Sonothrombolyse durchgeführt, die helfen, dieses Therapieverfahren besser einzuschätzen und die Wirkmechanismen besser zu verstehen. Eine Übersicht zu diesem Thema gibt eine kürzlich erschienene Arbeit (Nedelmann *et al.*, 2008a).

1.6.1 Grundlagen des Ultraschalls

Als Ultraschall werden alle akustischen Schwingungen in einem Frequenzbereich über 20 kHz (Kilohertz) bezeichnet. Die obere Schwelle des menschlichen Hörbereichs liegt zwischen 18 kHz und 20 kHz (Fercher, 1999; Millner et al., 1987). Ratten und Mäuse hören noch Töne bis zu einer Frequenz von 100 kHz (Kuttruff, 1988).

Die Entdeckung des Ultraschalls geschah zeitgleich mit der Entdeckung der Akustik. Vor allem zwei Daten sind darunter zu nennen: die Entdeckung und Untersuchungen an der Magnetostriktion (durch J.P. Joule, 1847) und Entdeckung des piezoelektrischen Effekts durch die Gebrüder Curie (1880). Die heutigen Ultraschallgeber sind alle mit einem Piezoelement ausgestattet, welches den Ultraschall erzeugt (Kuttruff, 1988).

Der Ultraschall wird durch verschiedene Parameter definiert. Als erstes zu nennen ist die Frequenz. Die erhältlichen Ultraschallgeräte arbeiten zwischen 20 kHz (Kilohertz) und mehreren Megahertz (MHz). Der nächste Parameter ist die Intensität, welche in W/cm^2 angegeben wird. Dabei beziehen sich die Quadratzentimeter auf die Fläche des Schallgebers. Ultraschall kann nicht nur als kontinuierliche Welle, sondern auch gepulst abgegeben werden. Die Pulsation wird ebenso wie die Frequenz in Hertz (Hz) angegeben (Pulsrepetitionsfrequenz). Eine weitere Einstellmöglichkeit ist der Duty Cycle (Einschaltdauer). Der Duty Cycle bezeichnet das Verhältnis zwischen On-Phase und Gesamtdauer des Pulszyklus. Beträgt also der Duty Cycle 50%, so werden in 50% der Zeiteinheit Schallwellen abgegeben. Die anderen 50% wird pausiert. Daraus folgt, dass bei gleicher zeitlich gemittelter Intensität die Schallamplitude bei einem geringen Duty Cycle erhöht ist (Abb. 1-5).

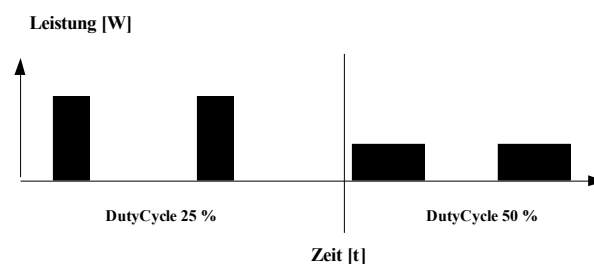


Abbildung 1-4: Grafische Darstellung des Duty Cycles

Der Duty Cycle beschreibt die Zeit, in der Ultraschall während eines Schallzyklus emittiert wird. Ist die zeitlich gemittelte Intensität konstant, so ist die Amplitude der Intensität bei kurzem Duty Cycle größer.

Als wichtige Effekte zwischen Gewebe und Ultraschall sind zwei im besonderen zu nennen. Zum einen ist dies die Erwärmung des Gewebes, welche durch Absorption der Schallenergie entstehen kann; und zum anderen kann es zu mechanischen Interaktionen auch durch sogenannte Kavitationen kommen. Unter Kavitation versteht man das Entstehen von kleinen

Dampfbläschen. Diese können explosionsartig kollabieren und somit das umliegende Gewebe schädigen (Kuttruff, 1988; Maurer, 1984).

Der Grund für thermische Wirkungen liegt darin, dass biologische Gewebe Ultraschallenergie absorbieren. Dies kann die Erwärmung desselben nach sich ziehen, was wiederum die Störung physiologischer Prozesse nach sich zieht. Tritt Ultraschall durch den Knochen, wird ein Teil der Energie in Wärme umgewandelt (Church *et al.*, 2007).

1.6.2 Verwendung von Ultraschall in der Medizin

Die Einsatzmöglichkeiten von Ultraschall sind sehr vielfältig. Neben der bekannten Anwendungen in der Diagnostik fällt auf, dass Ultraschall sowohl für das Zerstören von Gewebe (Zelllyse), als auch zu therapeutischen Zwecken genutzt wird (Unterstützung der Wundheilung). In der Neurologie wird diagnostisch vornehmlich mit Doppler- oder Duplexsonografie gearbeitet. Diese Methode beruht auf dem durch Christian Doppler erstmalig beschriebenen Doppler-Effekt. Es handelte sich hierbei um die Beobachtung, dass Wellen von Objekten unterschiedlicher Geschwindigkeit mit unterschiedlicher Frequenz reflektiert werden (Frequenzverschiebung) (Fercher, 1999). Somit kann die Fließgeschwindigkeit von Blut in verschiedenen Gefäßen bestimmt werden. Hierbei wird mit Hilfe eines Ultraschallgebers und eines Empfängers die Frequenzverschiebung ermittelt. Mit Hilfe dieser Methode können beispielsweise Gefäßverengungen (Stenosen) oder Verschlüsse diagnostiziert werden (Poeck & Hacke, 2006). Neben diagnostischen Anwendungen werden in der Medizin für therapeutische Zwecke, aber auch für Anwendungen im Labor mechanische und thermische Effekte von Ultraschall genutzt. Eine häufig genutzte Wirkung von Ultraschall beruht auf der Grundlage der Kavitation (Entstehung von Dampfbläschen). Hiermit kann Ultraschall zur Reinigung verschiedener Stoffe und Geräte (z.B. Reinigungsbäder) eingesetzt werden. Es kommen dabei Leistungen von 5-25 W/l und Frequenzen von 20-60 kHz zur Anwendung (Millner *et al.*, 1987). Das Lysieren von Zellen geschieht mit Ultraschall der Frequenzen zwischen 10 kHz und 1 MHz. Des Weiteren werden Ultraschallgeräte auf Basis des Kavitationseffektes auch als chirurgische Werkzeuge, im Sinne eines Ultraschallskalpells, eingesetzt, um Gewebe wie Haut, Muskel oder Knochen zu schneiden. Hierbei wird eine Skalpellklinge mit Ultraschall der Frequenz von 55 kHz zum schwingen angeregt (Millner *et al.*, 1987). In der Tumorthherapie (Hyperthermiebehandlung) aber auch zur Therapie von Muskelverspannungen werden thermische Effekte des Ultraschalls genutzt. Das Gewebe erwärmt sich dabei um ca. 3 bis 5°C (Pounder *et al.*, 2008).

1.6.3 Entwicklung der Ultraschallthrombolyse

Die Idee der Ultraschallthrombolyse geht auf eine Arbeit von G. Trübestein im Jahr 1976 zurück. In dieser Arbeit wurde erstmals die Möglichkeit beschrieben, mit Ultraschall *in vitro* Blutgerinnsel zu lysieren (Trübestein *et al.*, 1976). Erst in den 90er Jahren wurde die Ultraschallthrombolyse zu einem eigenständigen Forschungsfeld entwickelt. Seit dem steigt die Anzahl der Publikationen stetig an (Abb. 1-5).

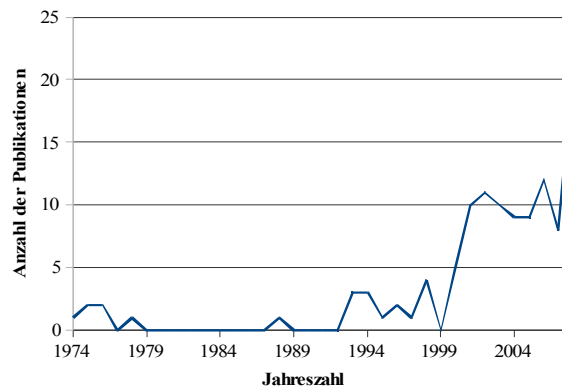


Abbildung 1-5: Ultraschallthrombolyse in der Literatur (1974-2008)

Die Grafik wurde mit Hilfe der Internetplattform Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Stand: 18.12.08) erstellt. Als Suchbegriffe wurden Ultrasound und Thrombolysis eingegeben und nur die thematischen Artikel gewertet, deren Titel die gesuchten Begriffe enthielten.

Zunächst war der Einsatz von Ultraschall rein experimenteller Natur und wurde *in vitro* an Blutgerinnseln (Behrens *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1993; Nedelmann *et al.*, 2002a) und *in vivo* an verschiedenen Verschlussmodellen (Schneider *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2001; Trübestein *et al.*, 1976; Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007) durchgeführt.

Erste klinische Hinweise auf eine Verbesserung der rekanalisierenden Wirkung des Fibrinolytikums rt-PA beim Schlaganfall durch die Applikation von Ultraschall ergab eine Studie von Alexandrov (Alexandrov *et al.*, 2000). Die bisher größte klinische Studie ist die CLOTBUST Studie von Alexandrov und Mitarbeitern (Alexandrov *et al.*, 2004). In dieser Studie wurden 126 Patienten mit rt-PA behandelt und nach Randomisierung die Hälfte der Patienten mit 2 MHz-Doppler-Ultraschall beschallt. Dies führte zu einer signifikanten Verbesserung der Rekanalisation (komplette Rekanalisation von 49% verglichen mit 30% in der Kontrollgruppe). Darüber hinaus gibt es tierexperimentelle und klinische Studien, die sich mit einer weiteren Verbesserung des Therapieeffektes (im Vergleich zur Dopplersonografie) beschäftigen. Hierzu gehören die Evaluation anderer Frequenzbereiche (kHz) (Behrens *et al.*, 1999; Nedelmann *et al.*, 2002a) oder der zusätzliche Einsatz von Echosignalverstärkern (Molina *et al.*, 2006). Der Einsatz von Echosignalverstärkern scheint viel versprechend, ein positiver Effekt (verbesserte

Rekanalisierung) wurde in einer klinischen Studie angedeutet (Molina *et al.*, 2006). Niederfrequenter Ultraschall, *in vitro* viel versprechend und effektiver als höhere Frequenzen, fiel *in vivo* in Tiermodellen bisher vor allem durch den Therapieeffekt überlagernde Nebenwirkungen auf (Ödembildung und Entstehung von Blutungen) (Schneider *et al.*, 2006; Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007). Bei diesen Nebenwirkungen muss vornehmlich an zwei verschiedene Mechanismen gedacht werden: 1. thermische Effekte und 2. Kavitation.

Neben direkten mechanischen Wirkungen des Ultraschalls auf das behandelte Gewebe (mit z.B. Induktion von Blutungen) können auch chemische Reaktionen induziert werden (z.B. Sauerstoffradikalbildung) (Church *et al.*, 2007; Stratmeyer *et al.*, 2008). Die Bildung von freien Radikalen kommt zustande, da entstehende Bläschen mit Wasserdampf gefüllt sind. Dieser Wasserdampf begünstigt die Bildung von freien Radikalen (H[•] oder OH-Radikale) (Verrall & Seghal, 1988). Diese Radikale haben zwar eine kurze Halbwertszeit, können jedoch zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) beitragen, welches wesentlich stabiler ist und nachgewiesenermaßen Einzelstrangbrüche der DNA herbeiführen kann (Miller *et al.*, 1991).

Diagnostischer Ultraschall ist in hohem Maße als sicher anzusehen (Bernstine *et al.*, 1969; Stratmeyer *et al.*, 1982). Aufgrund der –außerhalb diagnostischer Anwendungen -möglichen Schädigung von Ultraschall, bedingt durch eine abweichende Parameterwahl, müssen therapeutische Geräteneuentwicklungen vor einem klinischen Einsatz *in vivo* im Tiermodell und *in vitro* auf ihre Sicherheit in der Anwendung und auf die Sinnhaftigkeit der Parameterwahl gründlich evaluiert werden.

1.6.3.1 Verschiedene Formen der experimentellen Ultraschallthrombolyse

In der experimentellen Ultraschallthrombolyse können zwei Therapieansätze unterschieden werden, die intraluminale Ultraschallapplikation und die transkranielle Ultraschalltherapie. Grundlegend ist zu sagen, dass die intraluminale, kathetergestützte Anwendung wesentlich aufwändiger ist und potenzielle klinische Anwendungen auf wenige spezialisierte Zentren begrenzt bleiben würden. Die transkranielle Therapie ist potenziell einfach anzuwenden und stünde so einer Vielzahl von Patienten in auch weniger spezialisierten Zentren zur Verfügung. Aus diesem Grund verfolgt unsere Arbeitsgruppe den Ansatz der transkraniellen Behandlung. Beide Therapieformen sollen in den folgenden Absätzen erläutert werden.

Die Methode der **intraluminalen Lyse** basiert auf der Entwicklung von Kathetersystemen, welche direkt bis zum Thrombus über einen Zugang vorgeschoben werden können (Atar *et al.*, 2001; Hamm *et al.*, 1997; Trübestein *et al.*, 1976). Als erfolgreich wurde dies bisher nur in der Behandlung von peripheren Arterienverschlüssen und beim Herzinfarkt eingesetzt. Die

verwendeten Frequenzen liegen im niederfrequenten Bereich (um 20 kHz) (Hamm *et al.*, 1997; Sipahi *et al.*, 2006). Diese Technik jedoch scheint für den Einsatz beim Schlaganfall weniger geeignet, da intrakranielle Gefäßverschlüsse mit Kathetersystemen schlechter erreichbar sind.

Mittlerweile gibt es auch für die Anwendung an hirnversorgenden Gefäßen ein experimentelles Kathetersystem, welches mit Frequenzen von 1,7-2,1 MHz arbeitet und auf eine Wirkverbesserung von rt-PA abzielt (Nedelmann *et al.*, 2008b). Ein definitiver Wirksamkeits- und Sicherheitsnachweis muss hier noch erbracht werden.

Die Idee der **transkraniellen Ultraschallthrombolyse** besteht darin, ein nicht-invasives Verfahren zu entwickeln. Hierbei wird die Ultraschallsonde bevorzugt temporal auf den Schädel aufgesetzt. Die Ultraschallweiterleitung geschieht über Ultraschallgel als leitendes Medium. Ein solches Verfahren könnte leichter an weniger spezialisierten Schlaganfall-Zentren durchgeführt werden. Die Entwicklung spezieller therapeutischer Geräte befasst sich in experimentellen Studien in erster Linie mit niederfrequentem Ultraschall. Bei *in vitro* guter Wirksamkeit wurden allerdings *in vivo* im Tierversuch verschiedene die Wirkung überlagernde Nebenwirkungen beobachtet, welche abhängig von der Parameterwahl waren. Diese waren intrazerebrale Blutungen (Daffertshofer *et al.*, 2004), vasogenes oder zytotoxisches Hirnödem (Schneider *et al.*, 2006; Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007) sowie Gewebnekrose (Schneider *et al.*, 2006). In der Studie von Wilhelm-Schwenkmezger kam es zu einer erhöhten Sterblichkeit der Versuchstiere in der Schallgruppe. Eine weitere experimentelle Studie hingegen (Saguchi *et al.*, 2008) untersuchte niederfrequenten Ultraschall der Frequenz 490 kHz im Tiermodell und konnte eine signifikante Verbesserung des funktionellen Outcomes der Tiere ohne Hinweis auf vermehrte Nebenwirkungen nachweisen. Eine klinische Studie mit einem spezifischen therapeutischen niederfrequenten (300 kHz) Ultraschallgerät wurde jedoch vorzeitig abgebrochen, da die Patienten vermehrt intrakranielle Blutungen aufwiesen (Daffertshofer *et al.*, 2005). Dies zeigt die erhebliche Problematik, die der Entwicklung spezieller Ultraschalltherapiegeräte zugrunde liegt. Zusammenfassend ist der therapeutische Ultraschall (abseits der diagnostischen Einstellungen) eine grundsätzlich viel versprechende Methode, deren Vorteile jedoch in tierexperimentellen Studien sorgfältig gegen das Auftreten von Nebenwirkungen abgewogen werden muss.

1.6.4 Wirkung von Ultraschall auf die Genexpression

Erstmals wurde 1964 der Effekt von Ultraschallvibrationen auf die Proteinsynthese in Maus-Tumorzellen beschrieben (Von der Decken *et al.*, 1964). Von da an finden sich in steigender Anzahl Publikationen, die sich mit der Wechselwirkung von Ultraschall und Proteinsynthese

oder Genexpression beschäftigen. Experimentelle Studien konnten einen Effekt von niedrig intensivem, gepulstem Ultraschall auf die Genexpression von Knochenzellen *in vitro* nachweisen (Sant'Anna *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2005); auch diese Anwendung wurde im höherfrequenten Ultraschallspektrum durchgeführt (ca. 1,5 MHz). Ziel dieser Studien war es, die Wirkung von Ultraschall auf kultivierte Knochenmarkszellen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass unter Ultraschalleinfluss sich die Proliferation von Knochenzellen erhöht. Bei der Unterstützung der Knochenheilung wird Ultraschall bereits eingesetzt. Hier wurde nachgewiesen, dass mit 1 MHz Ultraschall das iNOS-Expressionslevel in Osteoblasten angehoben werden kann (Tang *et al.*, 2007). Osteoblasten sind für das Knochenwachstum essentiell. NO spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Ausdifferenzierung der Osteoblasten. Ein Anstieg der iNOS hätte den Anstieg der NO-Konzentration zur Folge, so dass hiermit die Osteoblastenentwicklung gefördert werden könnte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Ultraschall (1 MHz) einen fördernden Effekt auf die Proliferation von Zementoblasten hat (Inubushi *et al.*, 2008), welche für den Erhalt der Zahnwurzeln verantwortlich sind und das Wurzelzement produzieren. Der thermische Effekt von Ultraschall wurde auch schon bei der Behandlung von Tumorgewebe eingesetzt, da Gene wie das Hitze-Schock-Protein 70 in ihrer Expression enorm gesteigert werden können. In dieser Studie wurde 1,1 oder 3,3 MHz Ultraschall eingesetzt. Es handelte sich jedoch hierbei um stark fokussierten Schall (Liu *et al.*, 2006). Dies könnte nach Angaben der Autoren zu einer verbesserten Tumorthherapie führen. Des Weiteren konnte ein aktivierender Effekt von Ultraschall auf die mitochondriale Apoptosekette in Krebszelle nachgewiesen werden, welcher durch den Einsatz eines Kontrastmittels noch verstärkt werden konnte (Furusawa *et al.*, 2009).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die meisten Arbeiten, welche sich mit Ultraschall und Genexpression beschäftigen an Muskeln oder Knochen bzw. deren Zelllinien durchgeführt wurden. Des Weiteren wurde stets Ultraschall mit Frequenzen um die 1 MHz verwendet.

Als weitere Technik wird Ultraschall in der Sonoporation von Zellen eingesetzt, um Reporter-Plasmide in Zellen verschiedener Gewebe einzuschleusen (Bao *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1996; Lawrie *et al.*, 2000; Taniyama *et al.*, 2002). Die Transfektion verschiedener Zelllinien geschieht mit Ultraschall im MHz-Frequenzbereich. Dieser Effekt ist dosisabhängig, da bei zu langer Insonationszeit die Transfektionsrate sinkt (Unger *et al.*, 1997). Als Grund für das Einschleusen von Fremd-DNA wird Kavitation angesehen (Koch *et al.*, 2000). Verstärkt wird dieser Effekt durch die Gabe von Echosignalverstärkern (Lawrie *et al.*, 2000), welche auch die Gewebeverträglichkeit erhöhen (Lu *et al.*, 2003). Echosignalverstärker sind kleine Gasbläschen, welche von einer Membran umgeben sind.

1.6.5 Auswahl von Kandidatengenen zur Messung der Genexpression nach Ultraschallbehandlung

Die Auswahl der Kandidatengene geschah mit Hilfe der Datenbank pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Folgend sollen die Kandidatengene dargestellt werden.

| | Gen | Abkürzung | Funktion | Literatur |
|--------------------|---|--------------------|---|--|
| Apoptose | Caspase-3 | Caspase-3 | Induktion des neuronalen Zelltods | Chen, 1998 |
| | Caspase-9 | Caspase-9 | Aktivierung von caspase-3 | Porter, 1999 |
| | Proteinkinase B | Akt-1-3 | Einfluss auf caspase-9 Aktivierung; Aktivierung von akts kann den apoptotischen Zelltod blockieren | Cardone, 1998 Dudek, 1997 Song, 2008 |
| | engl. B-cell- lymphoma | Bcl-2 | Blockade des apoptotischen Zelltods durch Verhinderung der Procaspasenaktivierung | Newmeyer, 2000 |
| | engl. Apoptosis Inducing Factor | AiF | Stammt aus Intermembran der Mitochondrien und wandert in den Zellkern, wo er Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auslöst | Lorenzo, 1999 |
| | engl tumor necrosis factor | TNF- α | Zytokin, welcher nicht zu den Apoptosemarkern gehört, jedoch auch zum Überleben der Zelle benötigt wird; Wirkung auf Immunsystem, Entzündungsreaktionen und Angiogenese; Assoziation mit neuronalen Schäden | Malik, 1988 Knoblach, 1999 |
| Angiogenese | engl. Vascular Endothelial Growth Factor | VEGF | Gabe von VEGF nach zerebraler Ischämie führt zu einer Minderung des neurologischen Defizits und erniedrigt die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke | Zhang, 2000 |
| | engl. Epidermal Growth Factor | Egf-1 | Angiogenese-assoziiierter Transkriptionsfaktor; Expressionsanstieg 2h nach induzierter Ischämie; geringere Läsion nach knock-out von egr1 bei Mäusen | Khachigian, 2006 Tureyen, 2008 Yi, 2007 |
| | engl. Epidermal Growth Factor Receptor | Egfr | Aktivierung dieses Rezeptors führt zu gesteigerter DNA Synthese und Zellproliferation; Stimulation des Rezeptors führt nach zerebraler Ischämie zu Neuroprotektion; ein Fehlen des Rezeptors führt zu Neurodegeneration | Chen, 1987 Ono, 2006 Justicia, 1999 Sibilia, 1998 |
| | Ephrin-5 | EFNA | Mitglied der Familie der Tyrosinkinase-Liganden; gesteigerte Expression nach induzierter Ischämie wird damit assoziiert, dass Schädigung des Gewebes entgegen gewirkt werden soll | Flanagan, 1998 Winslow, 1995 Carmichael, 2005 |
| | Angiopoietin-01 | Ang-01 | Ligand des Tie2-Rezeptors; wichtige Rolle bei der Stimulierung der Angiogenese und vermindert die vaskuläre Permeabilität von Gefäßen; Expressionsanstieg nach zerebraler Ischämie, bereits kurz nach Induktion | Karamysheva, 2008 Zhang, 2002 Hayashi, 2003 |
| | Angiopoietin-02 | Ang-02 | Ligand des Tie2-Rezeptors; Antagonist von Ang-01; wirkt demnach der stabilisierenden Wirkung entgegen; Ang-02 kann nur in Gegenwart von VEGF seine Wirkung voll entfalten; Expressionsanstieg nach zerebraler Ischämie, bereits kurz nach Induktion | Karamysheva, 2008 Zhang, 2002 Hayashi, 2003 |
| Stressfaktoren | engl. Heat Shock Protein 27 | Hsp27 | Unterbindet apoptotische Prozesse, indem es Cytochrom C und TNF- α vermittelten Zelltod verhindert; Expressionsaktivierung geschieht über verschiedene Faktoren wie Hitze oder oxidativen Stress; Überexpression von hsp27 wirkt protektiv | Arya, 2007 Schmitt, 2007 Dillmann, 1999 |
| | engl. Heat Shock Protein 70 | Hsp70 | Inhibiert die Translokation von Bax in den Mitochondrien und die Aktivierung der Caspasen; Expressionsaktivierung geschieht über verschiedene Faktoren wie Hitze oder oxidativen Stress; Überexpression von hsp70 wirkt protektiv | Arya, 2007 Schmitt, 2007 Dillmann, 1999 |
| | engl. Immediate Early Gene | IEGs (c-fos/c-jun) | Beide Gene sind in ihrer Aktivität aneinander gebunden; Expressionsinduktion geschieht durch Stress wie pharmakologische Agentien, Ischämie oder Strahlung | Sng, 2004 Kamme, 1995 |
| NO-Synthase | neuronale NO-Synthase | nNOS (Typ I) | Vorkommen hauptsächlich in Neuronen, wo es NO produziert, welches vornehmlich zur Vermittlung der synaptischen Plastizität, neuronaler Signaltransduktion und nach Schädigung sogar zur Vermittlung der Neurotoxizität produziert wird; konstitutive Expression, jedoch vermehrt nach pathologischen Einflüssen | Samdani, 1997 |
| | induzierbare NO-Synthase | iNOS (Typ II) | Bildungsort sind die Astrozyten und Mikroglia \rightarrow proinflammatorische Wirkung; Aktivierung von caspase3 und 9; geringe Mengen an synthetisiertem NO wirken neuroprotektiv; sehr geringe Expression in nativem Gewebe; deutliche Induktion der Expression nach pathologischen Einflüssen | Samdani, 1997 Saha, 2006 Nomura, 2004 |
| | endotheliale NO-Synthase | eNOS (Typ III) | Bildungsort sind Endothelzellen und wie die iNOS wird eNOS hauptsächlich unter pathologischen Einflüssen exprimiert; neuroprotektive Rolle, da der Blutfluss reguliert wird | Samdani, 1997 |
| ox. Stress/Globine | engl. nuclear factor- ϵ -rythroid 2-related factor | Nrf2 | Transkriptionsfaktor, welcher mehrere oxidative Stressgene reguliert; Nrf-2 schützt das Gehirn vor oxidativem Stress | Shah, 2007 Shih, 2003 |
| | Superoxid-Dismutase-1 | SOD-1 | Schützt gegen Superoxidtoxizität; aktives Zentrum besteht aus Kupfer; Lage im Zytosol und Intermembranraum der Mitochondrien | Culotta, 2006 Scandalios, 2005 Wamer, 2004 |
| | Superoxid-Dismutase-2 | SOD-2 | Schützt gegen Superoxidtoxizität; aktives Zentrum besteht aus Mangan; Lage in der Mitochondrienmatrix | Culotta, 2006 Scandalios, 2005 Wamer, 2004 |
| | Hämoxygenase-1 | Hmox1 | Schutz vor Sauerstoffstress; wirkt anti- inflammatorisch, -apoptotisch und -proliferativ | Morse, 2002 Tsuchihashi, 2004 |
| | Neuroglobin | Ngb | Mitglied der Globinfamilie; speichert vermutlich Sauerstoff in Neuronen; Überexpression vermindert die Schäden nach einer zerebralen Ischämie oder Hypoxie | Burmester, 2004 Bunori, 2006 Greenberg, 2008 |
| | Cytoglobin | Cygb | Mitglied der Globinfamilie; Sauerstoffspeicherfunktion wird diskutiert; genaue Funktion bislang unklar | Burmester, 2004 Pesce, 2002 |

Tabelle 1-1: Kandidatengene aus der Literaturrecherche

Die gewählten Gene wurden aufgrund ihrer häufigen Nennung und Wichtigkeit in der Literatur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) selektiert.

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage der Vorversuche der Arbeitsgruppe eine detaillierte Analyse von Bioeffekten niederfrequenten Ultraschalls (60 kHz) an ischämischem und gesundem Hirngewebe durchzuführen. Hierbei stand die Evaluation potenzieller schädigender Wirkungen des Ultraschalls (Sicherheitsevaluation) im Vordergrund.

Um der Vielzahl möglicher Wirkungen des Ultraschalls gerecht zu werden, sollten unterschiedliche Methoden zur Analyse herangezogen werden. Tierexperimentelle Techniken (operative Eingriffe zur Induktion einer fokalen Ischämie), funktionelle Untersuchungen mit neurologischer Evaluation der Tiere, Prüfung des Hörvermögens sowie histologische Techniken (TTC- und HE-Färbung) und kernspintomographische Analyseverfahren, bis hin zu molekular-genetischen Untersuchungen sollten hierfür Verwendung finden.

Ziel des ersten Teils der Arbeit würde die Evaluation potenziell unerwünschter Wirkungen niederfrequenten 60 kHz Ultraschalls an gesundem und ischämischem Hirngewebe sein. Hierfür sollten im Fadenmodell sowohl die Bedingungen einer permanenten Ischämie, als auch die Situation der Reperfusion untersucht werden. Hierbei war geplant 60 kHz Ultraschall in einer Einstellung zur Anwendung zu bringen (mittlerer Duty Cycle, geringe Intensität), von der ein Therapieeffekt zu erwarten ist. Die Auswertung sollte durch kernspintomographische, histologische und funktionell-neurologische Techniken erfolgen.

Ausgehend vom ersten Versuchsteil sollten im Anschluss Effekte verschiedener Duty Cycle-Einstellungen auf ischämisches Hirngewebe untersucht werden. Zusätzlich zu obigen Untersuchungstechniken empfahl es sich vor dem Hintergrund einer potenziellen Hörschädigung durch Ultraschall Versuchsreihen zur Wirkung auf das Innenohr durchzuführen (akustisch evozierte Potenziale).

Im dritten Versuchsteil sollte die mögliche und bisher nicht analysierte Wirkung des Ultraschalls auf die Genexpression in gesundem Gewebe untersucht werden. Ein Vergleich des 60 kHz-Ultraschallgeräts mit anderen Frequenzen (488 kHz und 3 MHz) und Geräteeinstellungen, die zuvor anhand anderer Analysen keine schädigenden Wirkungen gezeigt hatten, sollte Aufschluss über mögliche Mechanismen geben. Die Wirkung auf die Expression selektiv gewählter Kandidatengene sollte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (4 h und 24 h nach der Ultraschallbehandlung) analysiert werden. Ergänzend sollten zu jedem Zeitpunkt Ischämieproben als Positivkontrollen für Änderungen der Genexpression mitgeführt werden. Die Selektion der Kandidatengene wurde mit Hilfe der Literatur vorgenommen und zunächst diejenigen Gene herausgegriffen, welche am häufigsten als Stressgene unter ischämischen

Ereignissen als differentiell reguliert beschrieben wurden. Anschließend sollten die Expression dieser Gene in funktionelle Gruppen unterteilt (Apoptose, Angiogenese, Transkriptionsfaktoren, NO-Synthasen, Stressmarker, Sauerstofftransport) durch quantitative Real-Time RT-PCR untersucht werden. Verschiedene technische Möglichkeiten einer globalen Genexpressionsanalyse nach Ultraschallbehandlung sollten durch die Mikroarray-Technologie probiert werden. Dabei sollten Arrays der Hersteller Operon und Affymetrix getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche fanden männliche Wistar Ratten entweder von Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland oder Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland Verwendung. Alle Tiere hatten ein Gewicht zwischen 300-400 g und ein Alter von 2,5 bis 3 Monaten. Die Wistar Ratte wurde erstmals 1906 am Wistar Institute, Philadelphia, USA beschrieben. Es handelte sich hierbei um einen Rattenstamm unbekannter Herkunft, der sich bis 1922 am Wistar Institut etablierte (www.harlaneurope.com/main.htm; Stand 26.12.08).

2.2 Narkose

Als Narkose kam Isofluran bei den Tierversuchen dieser Arbeit zum Einsatz. Das Anästhetikum Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether) stammt aus der Gruppe der Flurane, welches als Inhalationsanästhetikum verwendet wurde.

Die Einleitung der Narkose geschah durch Einleiten von 5 Vol% Isofluran in eine Gaskammer. Sobald die Ratte bewusstlos war, wurde sie auf einer Heizmatte (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) platziert und mit 2-3 Vol% Isofluran beatmet.

2.3 Operationstechniken

2.3.1 Fadenmodell – permanentes Verschlussmodell

Nach erfolgter Narkoseeinleitung mit Isofluran wurde das Tier an der Halsunterseite rasiert und ein medialer Hautschnitt von ca. 2,5 cm Länge angelegt. Zur Darstellung der Arterien wurde der *Musculus digastricus* am kaudalen Ende eingeschnitten. Die *Arteria carotis communis* (ACC) wurde permanent ligiert und auch die *Arteria carotis externa* (ACE) zusammen mit der *A. hypothalamica* permanent verschlossen. Die *Arteria carotis interna* (ACI) wurde lediglich mit einer Schlingligatur versehen. Nach temporärer Ligation der ACI wurde die ACC mit einer Mikroschere eröffnet, so dass ein mit silikonbeschichteter, 3 cm langer 4-0 Nylonfaden (Okkluder) eingeführt werden konnte. Dieser wurde bis zur Ligatur der ACI vorgeschoben und dann mit einer eigenen Ligatur locker fixiert. Die Ligatur der ACI musste nun eröffnet werden, um den Okkluder weiter vorschieben zu können. Anschließend wurde der Okkluder bis zu einem

leichten Widerstand vorgeschoben (Abb. 2-2). Die Distanz des Okkluderendes bis zur Bifurkation *ACI-ACE* betrug nun zwischen 18-20 mm. Die Ligatur um den Okkluder wurde verschlossen, so dass er seine Position nicht mehr ändern konnte. Die Haut der Ratte wurde genäht und das Tier noch so lange gewärmt, bis es vollständig erwacht war. Dann wurde es in seinen Käfig zurückgesetzt.

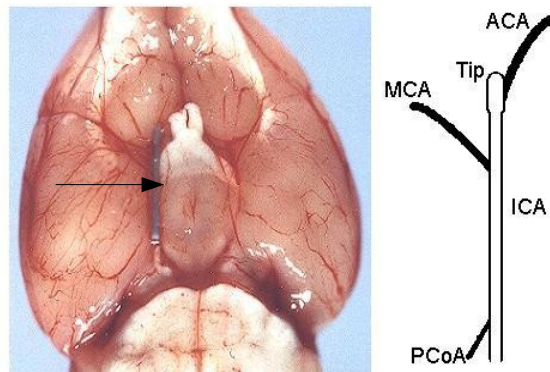


Abbildung 2-1: Ventralansicht des Gehirns mit Nylon-Okkluder

Links dargestellt ist die Lage des Okkluders in der A. communis interna (Pfeil). Auf der rechten Seite ist das Schema mit der korrekten Gefäßzuordnung (Walberer, 2005)

2.3.2 Fadenmodell – Reperfusionmodell

Die Präparation des Reperfusionmodells verlief analog zum permanenten Verschlussmodell. 90 min. nach erfolgter Ischämie wurde unter erneuter Isofluran-Narkose der Okkluder aus der *ACC/ACI* gezogen und die Ligatur in Höhe des Einschnitts fest verschlossen. Trotz verschlossener *ACC* findet eine Reperfusion über die *A. communicans anterior* und *posterior* statt. Nach erfolgter Reperfusion wurde der Hautschnitt genäht und nach dem Erwachen auf der Heizmatte die Ratte in ihren Käfig zurückgesetzt.

Fadenherstellung

Die Fäden wurden nach Takano et al. (Takano *et al.*, 1997) selbst hergestellt. Hierzu wurden 4-0 Nylon Fäden in gerade ca. 4 cm lange Stücke geschnitten und an einem LötKolben ein Ende des Fadens unter Sicht abgerundet bzw. leicht verdickt. Zum Beschichten der Fäden wurde ein Zweikomponenten Silikon (Provil Novo, Light, Heraeus, Hanau, Deutschland) verwendet. Dazu wurden kleine Papierstückchen präpariert, in die mit einer Kanüle (18 G; Braun, Melsungen, Deutschland) mittig ein Loch gestochen wurde. Die Fäden wurden in dieses Loch eingefädelt

und durch das Silikon gezogen. So konnte gewährleistet werden, dass die Fäden sich durch die Silikonbeschichtung nicht unregelmäßig verdicken. Abschließend wurden die Fäden zum Trocknen aufgehängt (ca. 2 Stunden) und dann noch auf eine Länge von 3 cm zugeschnitten.

2.4 Ultraschallprotokoll

Aufgrund der unterschiedlichen Schallkopfkonfiguration und -größe erfolgte für die verschiedenen Geräte die Ankopplung des Schallkopfes am Schädel des Versuchstieres mit unterschiedlicher Techniken:

Vor Behandlung mit der 60 kHz-Sonde wurde zunächst mit einem Längsschnitt die Kopfhaut eröffnet. Anschließend wurden die Schnittträger mobilisiert, etwas nach oben gezogen und an einen Metallring genäht (Ø ca. 2,5 cm). Das hierdurch entstehende Bassin wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%iger NaCl-Lösung) gefüllt. Die Sonde wurde in dieses Bassin getaucht und fixiert (Abb. 2-2). Der Abstand der Sonde zum Schädel betrug 1-3 mm. Während des Versuchs wurde das Bassin ständig mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt.

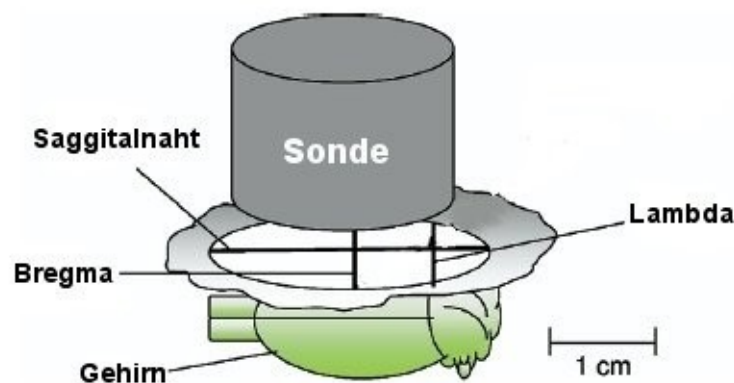


Abbildung 2-2: Setup mit der 60 kHz und 3 MHz Sonde

Zur deutlicheren Darstellung der Sondenplatzierung zeigt diese Abbildung den Zustand kurz vor der endgültigen Platzierung der Sonde in dem dargestellten Bassin an.

Ähnlich wie bereits für die 60 kHz-Sonde beschrieben, wurde für die Platzierung der 488 kHz-Sonde ebenfalls die Kopfhaut durch einen Längsschnitt eröffnet und Ultraschallgel auf die Kalotte aufgetragen. Die Sonde wurde zwischen *Bregma*- und *Lambdanaht* ins Gel getaucht und fixiert (Abb. 2-3).

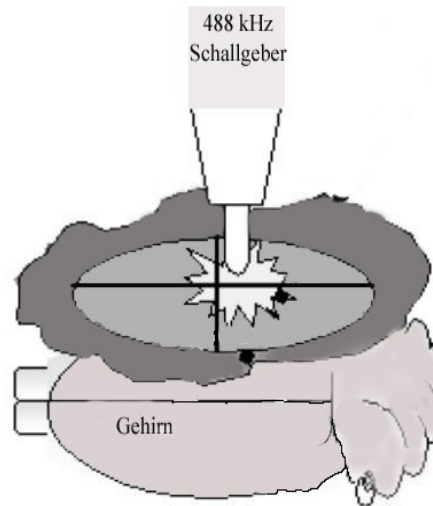


Abbildung 2-3: Sondenplatzierung der 488 kHz-Sonde

Ebenso wie für die 488 kHz-Sonde wurde auch bei der 3 MHz Sonde Ultraschallgel als Ankopplungsmedium verwendet. Die Haare wurden entfernt, die Kopfhaut allerdings wurde nicht vorher eröffnet. Eine Vorlaufstrecke gefüllt mit Ultraschallgel sorgte für den Kontakt der Sonde mit dem Rattenschädel.

Bei den Sonden mit 60 und 488 kHz wurde ein Intervallschema mit regelmäßigen Pausen zur Behandlung eingesetzt, um Temperatureffekte zu vermeiden. Hierfür wurde der Ultraschall jeweils für 2 Minuten eingeschaltet, gefolgt von 30 Sekunden Pause. Dies wurde viermal wiederholt, so dass sich ein Behandlungszyklus von 10 Minuten ergab. Dem folgte eine längere Pause von 5 Minuten. Anschließend wurde der gleiche Zyklus dreimal wiederholt. Schlussendlich ergab sich daraus eine Behandlungsdauer von 60 Minuten. Die Beschallung mit der 3 MHz Sonde erfolgte kontinuierlich.

2.5 *Temperaturmessung*

Mit Hilfe einer rektalen Messelektrode (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) wurde die Körpertemperatur der Ratte kontrolliert. Das Thermometer war mit einer Wärmematte regulatorisch (über eine Blanket Control Unit von Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) verbunden, so dass die Körpertemperatur der Ratten während des gesamten Eingriffs bei 37 °C konstant gehalten wurde.

Die intrakranielle Temperatur wurde bei einigen Tieren ermittelt, indem ein Thermometer (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) unter Narkose über ein kleines Bohrloch in der Kalotte einige Millimeter ins Hirngewebe eingeführt wurde. Die Messsonde des Thermometers wurde hierbei sorgfältig im Bereich der Ischämie in der rechten Hemisphäre platziert.

2.6 *MRT-Technik*

Alle Messungen mit dem MRT wurden an der Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim durchgeführt.

2.6.1 *Fixierung der Versuchstiere*

Die Messungen am Magnetresonanz Tomographen wurden an der immobilisierten Ratte durchgeführt. Die Narkose wurde während der gesamten Messzeit mit einer Konzentration von 1-2% Isofluran in 0,5 l/min. Luft geführt. Hierzu wurde das narkotisierte Tier in eine spezielle Haltevorrichtung gelegt. Die Fixierung geschah über das Befestigen der Schneidezähne in einer Kunststoffhalterung. Nachdem der Kopf wie beschrieben positioniert wurde, konnte er zur weiteren Fixierung in eine konusförmige Halterung hineingezogen werden. Anschließend wurde die Ratte im Tomographen platziert, sowie eine Atemfrequenzmesssonde positioniert, welche auf Höhe des ventralen Brustkorbes fixiert wurde. Die Atemfrequenz betrug stets 50-70/min. Eine rektale Messsonde maß die Körpertemperatur, welche über ein Wasserflusssystem bei 37°C gehalten wurde (Abb. 2-4).

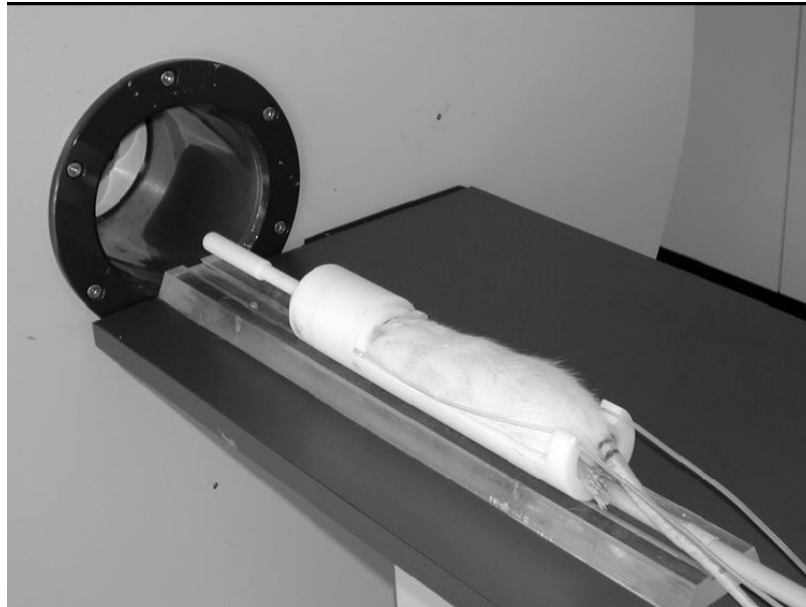


Abbildung 2-4: Ratte in der Halterung am MRT

Die Ratten wurden stets wie dargestellt fixiert, um ein Verwackeln der Aufnahmen zu verhindern (Walberer, 2005).

2.6.2 Der Magnetresonanztomograph (MRT)

Alle Messungen wurden mit einem Kernspintomographen von Bruker PharmaScan, Ettlingen, Deutschland, durchgeführt (Abb. 2-5). Die Frequenz des Scanners liegt bei 300,51 MHz für das Isotop ^1H . Er wird mit einem nach allen Seiten abgeschirmten Gradientensystem (300 mT/m) betrieben. Für die Messungen wurden die Ratten in einen linearpolarisierten Volumenresonator (\varnothing 60 mm) gelegt.



Abbildung 2-5: Magnetresonanztomograph Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T

(Walberer, 2005)

2.6.3 Bildgebung

2.6.3.1 Positionierung der Versuchstiere

Zur richtigen Positionierung der Tiere wurde vor der Messung eine separate Sequenz gefahren. Dabei handelte es sich um eine Spinecho-Sequenz mit einer Repetitionszeit (TR) von 150 ms und einer Echozeit (TE) von 12 ms. Die Schichtdicke betrug 4 mm. Die Messung von drei Schichten (axial, koronal und sagittal) machte die dreidimensionale Positionsbestimmung möglich. Nach der Positionsbestimmung wurde der Resonator so gedreht oder verschoben, dass die Position des Tieres die gewünschte Orientierung hatte.

2.6.3.2 Feineinstellung der Positionierung

Das genaue Bestimmen der Mittellinienverlagerung und Bestimmung des Läsionsvolumens macht es nötig, das Tier genau im MRT zu positionieren. Hierzu wurden mehrere RARE- (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) Sequenzen durchgeführt. Die Auswertung dieser Messdaten ermöglichte die genaue Positionsbestimmung der Tiere im Magnetfeld. Die verwendete RARE-Sequenz war eine T2-gewichtete Sequenz mit geringer Schichtdicke (1 mm). Die Messzeit betrug TR = 2.500 ms und TE = 41,8 ms. Nach der Durchführung der Messung wurde die koronare Schnittführung winkelnkorrigiert. Durch eine weitere RARE-Sequenz wurde die Position überprüft. Stimmt die Position nicht, wurde das Verfahren so lange wiederholt, bis die optimale Position gefunden war.

2.6.3.3 Diffusionsgewichtete Bildgebung

Vor den ersten Diffusionsmessungen musste der Diffusionskoeffizient des Wassers (ADC) ermittelt werden. Die diffusionsgewichteten Bilder wurden mit einer fettunterdrückenden EPI (Echo-Planar-Imaging)-Sequenz angefertigt. Die Verbesserung der Bildqualität wurde durch einen sogenannten Volumen-Shim erreicht. Hierbei handelte es sich um eine Sequenz mit Doppel-Spinecho (TR = 1 s, TE = 30 ms, Voxelgröße 10 x8 x15 mm³). Wenn das Wassersignal (FWHM) eine Halbwertsbreite von etwa 25-35 Hz erreichte, konnte mit den Diffusionsmessungen gestartet werden.

Die Diffusionsmessung umfasste sechs koronare Schnitte mit einer Dicke von je 2 mm. Diese waren stets aufeinander folgend. Das Field of view (FOV) betrug 32 x32 mm und die Matrixgröße 128 x128 (TR = 3003 ms, TE = 38,6 ms, 4 Mittelwerte/averages). Durch lokale Feldinhomogenitäten kann es zu Bildartefakten kommen. Daher wurde eine Fast-Segmentierung

verwendet, um die möglichen Bildartefakte zu minimieren. Die quantitative Erfassung des Wasser-Diffusionskoeffizienten (ADC) erfolgte über die Untersuchung von fünf unterschiedlichen Gradientenwerten (10, 40, 70, 100 und 130 mT/m). Die Gradientenseparationsdauer (Δ) betrug 15 ms und die Diffusionsgradientendauer (δ) 9 ms. Daraus ergaben sich fünf Werte (6.96, 111.3, 340.8, 695.6 und 1175,5 s/mm²). Zur weiterführenden Bearbeitung wurde die Software Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) verwendet.

2.6.3.4 T2-Bildgebung

Eine CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) Spinecho-Sequenz wurde zur Messung der T2-Relaxationszeit verwendet. Von 8 Schichten (Dicke 2 mm) wurde erfasst: das Field of view (FOV) hatte eine Größe von 37 x37 mm und eine Matrixgröße von 512 x256 mm (TR = 3833,5 ms; Anregungswinkel: 90° und Refokussierungswinkel: 180°; Number of Excitations (NEX) = 1). Auf diese Weise wurden 12 Echos dokumentiert. Von TE = 18 ms wurde eine aufsteigende Reihe bis 216 ms gebildet (Schrittgröße = 18 ms).

Ebenso wie die Bearbeitung der diffusionsgewichteten Bildgebung wurde auch für die T2-Bildgebung die Software Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) verwendet.

2.6.3.5 Protonen- und T2-gewichtete Bildgebung

Die planimetrische Bestimmung der Hemisphärenvolumina wurde über die T2-gewichteten Doppelkontrast-Spinechosequenzen gewährleistet. Ebenso wie schon bei der T2-Bildgebung wurden acht Schichten vermessen, welche koronal und aufeinander folgend waren. Die Schichtdicke betrug 2 mm. Das FOV hatte ein Ausmaß von 37 x37 mm und die Matrixgröße 512 x256 mm (TR = 3000 ms). Es wurden zwei Echos dokumentiert (TE = 27 ms und TE = 72 ms).

2.7 Neurologische Beurteilung der Tiere

Neurologischer Defizit Score

Die funktionelle Testung der Tiere wurde mit einem Neurologischen Defizit Score mit 9 bzw. 10 Elementen durchgeführt (Abb. 2-6). Dieser Score wurde von der eigenen Arbeitsgruppe zuvor an der Neurologischen Universitätsklinik in Mainz evaluiert (Nedermann *et al.*, 2007). Die Studie wurde mit dem neunteiligen Score durchgeführt. Bei akuten Versuchen (bis zu 24 h) wurde ein Item („Beam walk“) weggelassen, da dieses Item sich in der Akutphase nicht eignet. Dieser neurologische Score beinhaltet verschiedene motorische, koordinative und sensorische Elemente, welche mit den Werten zwischen 0 (keine Beeinträchtigung) und 10 (Beeinträchtigung) bewertet werden.

Kurzbeschreibung der Elemente:

- kontralaterale Vorderfußbeugung: Diese wird als pathologisch bewertet, wenn die Ratte nach vorsichtigem Anheben am Schwanz keine Extension der linken Vorderpfote zeigt (Zeichen einer Hemiparese)
- Instabilität bei seitlichem Druck von rechts
- Schwanzhängen: Die Ratte wird vorsichtig am Schwanz angehoben. Pathologisch ist ein Hochwinden der Ratte nach links in 3 reproduzierbaren Versuchen
- Laufen auf dem Beam („Beam walk“): Hier wird das Verhalten der Tiere auf dem Beam bewertet und mit dem Verhalten vor dem operativen Eingriff verglichen
- Laufen auf dem Boden: Hier gab es Abstufungen in der Bewertung. Eine abnormale Bewegung wie Zirkeln („circling“) oder eine driftende Bewegung („drifting“) wurde mit 5 bewertet, wohingegen eine Bewegungsunfähigkeit mit 10 bewertet wurde.
- Schnurrhaarbewegung: Pathologisch ist das Fehlen der Bewegungen auf der linken Seite
- Bewusstsein: Pathologisch ist die fehlende Reaktion des Tieres auf akustische oder andere Stimuli
- Hören: Zum Ermitteln des Hörvermögens wird über dem Tier außerhalb des Gesichtsfeldes mit den Händen geklatscht. Pathologisch ist die fehlende Schreckreaktion.
- Sehen: Reagierte das Tier auf keinen visuellen Stimulus von der linken Seite wird ein pathologisches Ergebnis gescort (Zeichen der Hemianopsie)

Insgesamt kann sich dadurch ein maximaler pathologischer Wert von 90 (bzw. 100) Punkten ergeben.

| Neuro Score | | Animal No. | | | | | | |
|---|-----|------------|---|---|---|---|---|---|
| Datum | Tag | -1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>contralateral forelimb flexion</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Flexion | 10 | | | | | | | |
| <i>Instability to lateral push from right</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Reduced | 10 | | | | | | | |
| <i>Tail hanging</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Upwinding to left | 10 | | | | | | | |
| <i>Walking on Beam</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Abnormal | 5 | | | | | | | |
| unable to walk on beam | 10 | | | | | | | |
| <i>Walking on ground</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Abnormal (drifting/circling) | 5 | | | | | | | |
| unable to walk on open ground | 10 | | | | | | | |
| <i>Whisker movement on left</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Absent | 10 | | | | | | | |
| <i>Consciousness</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| No reaction to stimuli | 10 | | | | | | | |
| <i>Hearing</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| Unable | 10 | | | | | | | |
| <i>Sensory</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| No reaction on left sided touch | 10 | | | | | | | |
| <i>Visions: Hemianopia</i> | | | | | | | | |
| Normal | 0 | | | | | | | |
| No reaction to threat from left | 10 | | | | | | | |
| Total Score | | | | | | | | |

Abbildung 2-6: Protokoll der neurologischen Bewertungen

In das Protokoll für die neurologische Beurteilung werden die verschiedenen Bewertungskriterien der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum dokumentiert.

2.8 Perfusionsexposition

Die histologische Aufarbeitung der Gehirne geschah meist an fixierten Geweben. Hierzu wurden die Ratten zunächst tief narkotisiert (5 Vol.% Isofluran). Anschließend wurde zuerst der Brustkorb und dann das Diaphragma eröffnet. Transkardial wurde physiologische Kochsalzlösung und dann 4%ige Paraformaldehydlösung infundiert. Nach erfolgter Perfusionsexposition wurde das Gehirn entnommen und für weitere 24 h in 4%iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt. Nach den 24 h in Paraformaldehydlösung wurden alle Gewebeproben in einen Phosphatpuffer eingebettet. (siehe 2.15. Lösungen und verwendetes Material)

2.9 Probenentnahme

Nach abgelaufener Versuchszeit wurden die Tiere euthanasiert und die Gehirne entnommen. Durch Einleitung der Gasnarkose (5% Isofluran in 3,0 l/min- Luft) wurden die Ratten tief anästhesiert. Im Anschluss erfolgte die Dekapitierung. Die Kopfhaut wurde mit einer Schere von caudal nach rostral eröffnet und der Schädel freigelegt, indem die Haut lateral weggezogen wurde. An der caudalen Seite des Schädels wurde das *Os occipitale* mit einer Knochenzange entfernt. Folglich hatte man Aufsicht auf das *Cerebellum*. Mit einem Schenkel der Knochenzange wurde vorsichtig unter die Kalotte gefahren und beide Hälften des Schädeldaches vom Gehirn abgehoben. Insofern die *Dura* noch intakt war, wurde diese mit der Knochenzange entfernt und das Gehirn mit einem feinen Spatel aus der Schädelkapsel heraus gelöst.

2.10 Histologie

2.10.1 TTC-Färbung



Abbildung 2-7: TTC-Färbung eines ischämischen Gehirns

Die intakten Bereiche werden bei der TTC-Färbung rot angefärbt, wohingegen die nekrotischen Areale weiß/ungefärbt erscheinen.

Seit 1958 wird 2,3,4-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) als Indikator für ischämische Infarkte verwendet (Jestedt R & Sandritter W,). Es ist wasserlöslich und kann durch verschiedene Enzyme reduziert werden. Es färbt sich das gesunde Gewebe tief rot, da die Enzyme der Elektronentransportkette das TTC als Protonenakzeptor nutzen und es zu einem fettlöslichen Formazan reduzieren (Glenner, & Orten, 1975) (Abb. 2-7).

1986 wurde erstmals der Einsatz von TTC im zerebralen Ischämie-Modell der Ratte beschrieben (Bederson *et al.*, 1986). In dieser Publikation wurde eine 2%ige TTC-Lösung in PBS-Puffer verwendet. In einer aktuelleren Publikation wurde eine 0,05%ige Lösung eingesetzt, welche ebenfalls für eine Studie verwendet wurde (Joshi *et al.*, 2004).

Das Gehirn wurde entnommen und in eine Gehirn-Matrix (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) gelegt. Die Matrix wurde in eine Schale mit kaltem PBS überführt (4°C) und dann in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Gehirnscheiben wurden in das vorgewärmte TTC (0,05%ig) gelegt und bei 38°C und für ca. 15-30 min. inkubiert. Zwischendurch wurde der Kontainer mit den Scheiben immer wieder geschwenkt, um ein gleichmäßigeres Färbeergebnis zu erhalten. Nach dem Färben wurde das TTC gegen eine 4%ige Paraformaldehydlösung ausgetauscht und dann die Gehirnscheiben für 24 h in den Kühlschrank gestellt (ca. 4 °C).

2.10.1.1 Planimetrie der histologischen Schnitte

Der Fixierung der Schnitte schloss sich die Dokumentation mit Hilfe eines Flachbettscanners an (Epson Perfection 1250, Meerbusch, Deutschland). Als Analyse-Software wurde das frei erhältliche Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. Die weißen Areale in den Schnitten wurden als Infarktareale bezeichnet und ausgemessen. Des Weiteren wurden die Hemisphären ausgemessen. Mit Hilfe einer Formel konnte anschließend das Läsionsvolumen ermittelt werden (Abb. 2-8).

$$\%HLV_e = \frac{HVC - HVi + LVu}{HVC} \cdot 100$$

Abbildung 2-8: Formel zur Berechnung des ödemkorrigierten Läsionsvolumens

(%HLV – Hemisphärisches Läsionsvolumen [%]; HVi – Hemisphärenvolumen ipsilateral; HVC – Hemisphärenvolumen contralateral; LVu – unkorrigiertes Läsionsvolumen)

2.10.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Diese histologische Technik wurde in der Abteilung für Neuropathologie (Leitung: Prof. Clemens Sommer) an der Uniklinik Mainz durchgeführt.

Nach der Hirnentnahme wurden die Gehirne in Paraformaldehyd mindestens 1 Tag (max. 3 Tage) gelagert. Anschließend wurden die Gehirne halbiert (Riechhirn + Kleinhirn entfernt) und in einer Kunststoffkassette platziert. Die weitere Aufarbeitung geschah wie im digitalen Anhang beschrieben.

2.10.3 Trichrom (Gomori Mixture):

Die Färbung mit Gomori Mixture geschah nach den etablierten Methoden (siehe digitaler Anhang) und wurde in der Abteilung für Neuropathologie/Mainz durchgeführt.

2.10.4 Immunhistochemische Färbungen

Ebenso wie die HE- und Trichrom-Färbung wurden auch diese Färbungen in Kooperation mit der Abteilung für Neuropathologie, Mainz durchgeführt. Folgende Antikörper wurden verwendet:

- GFAP Glial Fibrillary Acid Protein (1:600, Dako, monoklonal, Maus)
Bei GFAP (engl. Glial Fibrillary Acidic Protein) handelt es sich um ein Protein, welches mit Astrozyten assoziiert und somit für die Stabilität des Nervensystems mitverantwortlich ist.
- MAP2 Microtubule-associated Protein 2 (1:1.000, Sigma, monoklonal, Maus)
Bei MAP2 handelte es sich um Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Diese Färbung zeigte deutlich die Grenze zwischen Infarkt und Nicht-Infarktareal.
- CD68 Macrophage Glycoprotein (1:600, Dako, monoklonal, Maus)
CD68 ist ein Marker für Makrophagen und Mikroglia, welche nach pathologischen Einflüssen aktiviert werden.
- c-fos Transkriptions Faktor (1:200, Sigma, Antiserum, Kaninchen)
Der Transkriptionsfaktor c-fos wurde gefärbt, da er eine mögliche Stressreaktion belegen könnte.

2.11 Ultraschallgeräte

60 kHz

Das Ultraschallgerät mit der Frequenz 60 kHz ist eine Geräteentwicklung der Firma Bandelin, Berlin (Abb. 2-10). Die Geräteentwicklung und die Versuchsreihen zu diesem Gerät sind Teil eines Kooperationsprojektes mit der Firma Bandelin, welches durch das Bundeswirtschaftsministerium (Förderprogramm ProInno II) gefördert wurde.



Abbildung 2-9: Ultraschallgerät 60 kHz der Firma Bandelin, Berlin

488 kHz

Dieses Ultraschallgerät wurde von Prof. Hiroshi Furuhashi (Tokyo/Japan) entwickelt und ist eine Leihgabe an die AG Experimentelle Neurologie der Universität Gießen (Abb. 2-10).



Abbildung 2-10: Schallgeber und Ultraschallgerät 488 kHz-Sonde, Furuhashi/Tokyo/Japan

3 MHz

Hierbei handelt es sich um ein diagnostisches Gerät der Firma Philips (SONOS 7500, Bothell, Washington D.C, USA). Gearbeitet wurde mit einer 3 MHz transkraniellen Farbduplexsonde (Abb. 2-11).



Abbildung 2-11: Farbduplex Ultraschallgerät mit einer Frequenz von 3 MHz
Leihgabe der Firma Philips

2.12 Versuchsmaterial für molekular-genetische Untersuchungen

Als Versuchsmaterial diente Gehirngewebe von Wistar Ratten (Charles River, Sulzbach). Es wurden verschiedene Gewebeproben entnommen und zur weiteren Verarbeitung konserviert. Die Gewebeteile wurden postmortem entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.13 Molekular-biologische Standardmethoden

2.13.1 RNA-Extraktion aus Gehirngewebe

Das Gehirn besteht zu einem großen Anteil aus Fett. Eine RNA-Extraktion mit üblichen Extraktionskits ist daher schwierig. Folglich wurden Kits entwickelt, die speziell zur RNA Extraktion aus fettigem Gewebe (adipöses Gewebe und Gehirn) geeignet sind. In unserem Fall haben wir auf das RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) zurückgegriffen. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit der Modifikation des DNase Verdaus auf der Säule. Das Midi Prep Kit ist für Gewebeteile bis zu einer Größe von 500 mg geeignet. Die zu erwartende RNA Menge bei solch einer Gewebemenge ist 5-20 µg für Gehirngewebe bei einem Ausgangsgewicht von 10 mg. Die maximale Bindungskapazität der Säule beträgt 1 mg RNA.

2.13.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte mittels photometrischer Messung am Spektralphotometer (ND-1000, NanoDrop, Wilmington, CA, USA). Hierzu wurde je 1 µl der unverdünnten Probe verwendet (Abb. 2-12).

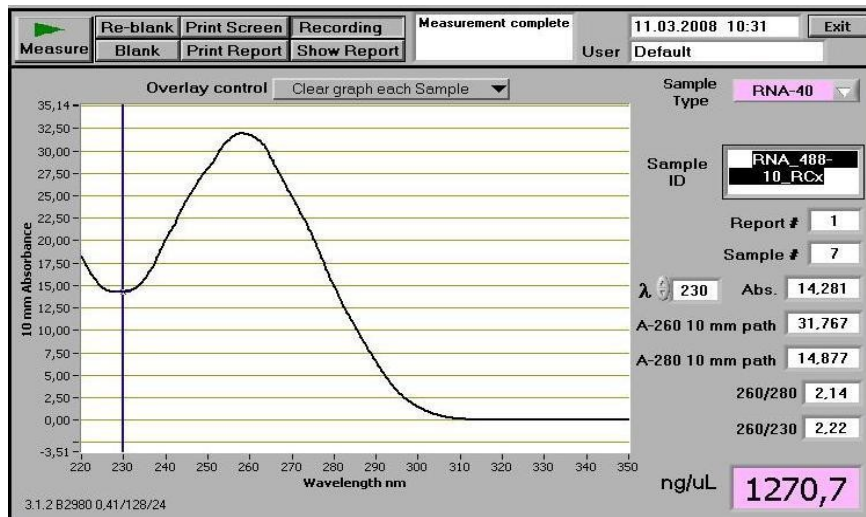


Abbildung 2-12: Screenshot von NanoDrop Messung

Mit Hilfe des NanoDrop konnte die RNA/DNA-Konzentration photometrisch ermittelt werden. Die Konzentration wurde stets in ng/µl angegeben.

2.13.2.1 Gelelektrophorese

Alle Gelelektrophoresen wurden mit vertikalen Elektrophoresekammern der Firma GENterprise (GENterprise™-Kammern, Mainz, Deutschland) und einem Spannungsgerät Consort E844 (Consort, Tornhout, Belgien) durchgeführt.

2.13.2.2 RNA-Gele

Die Analyse der RNA-Qualität wurde mit RNA-Formaldehydgelen (siehe 2.15. Lösungen und verwendetes Material) überprüft.

Probenvorbereitung für RNA-Gele:

0,5 µg gesamt-RNA

+ 1 µl konz. Ethidiumbromid (5 mg/ml)

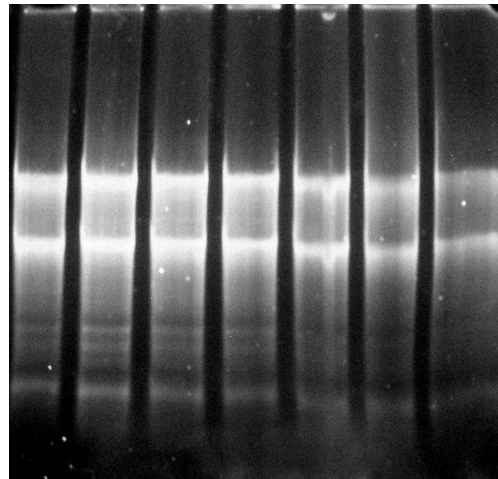
+ 3 Vol. loading Buffer

→ 70 °C für 10 min. (Thermoblock Labnet International Inc, Vortemp 56, Woodbridge, USA oder Wasserbad Grant Wasserbad, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), danach auf Eis

+ 0,1 Vol. RNA Dye

→ Gellauf bei 120-150 V für ca. 20-40 min.

Nach erfolgtem Lauf wurde das Gel dokumentiert. Hierzu wurde es auf den Transluminator (312 nm, IL-200-M, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) gelegt, mit einer Digitalkamera (Olympus Camedia, C-785 Ultra Zoom, Hamburg, Deutschland) aufgenommen und mit der Software Image Documentation System CS1 (Cybertec, Berlin, Deutschland) bearbeitet (Abb. 2 14).



28S-Untereinheit

18S-Untereinheit

Abbildung 2-13: RNA Gel

Das RNA-Gel zeigt das typische Bandenmuster. Besonders typisch die großen Banden der 18 S und 28 S Untereinheit der ribosomalen RNA.

2.13.2.3 DNA-Gele

Die qualitative Analyse der DNA wurde mit Agarose-Gelen durchgeführt.

Probenvorbereitung Agarose-Gel:

5-10 µl Probe

1/6 Volumen Loading Dye (Fermentas, St.Leon-Rot)

→ es wurde in eine Geltasche ~ 3 µl eines Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St-Leon-Rot) aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte wie bei den RNA-Formaldehydgelen bei 120-150 V für 20-40 min. Die Dokumentation erfolgte auf gleiche Weise wie unter 2.13.2.2 RNA-Gele beschrieben.

2.13.2.4 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde von 0,5 µg gesamtRNA ausgehend durchgeführt. Das verwendete Protokoll war SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Abweichend der Herstellerangaben wurde kein RNase-Inhibitor eingesetzt und daher die Menge des 5 x First Strand Puffers auf 5 µl erhöht. OligodT-Primer (16 mer,

500 ng/ μ l, Operon, Köln, Deutschland) wurden verwendet und die entstandene synthetisierte cDNA nach abgelaufener Reaktion 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt.

2.13.2.5 PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Primus 96 advanced Thermocycler (PEQLAB, Reutlingen, Deutschland) durchgeführt. Zwei unterschiedliche Taq-Polymerasen wurden für die PCR-Reaktionen verwendet. Zum einen eine DNA Polymerase der Firma Sigma (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und zum anderen eine Bluetaq DNA Polymerase von Roboklon (Roboklon, Berlin, Deutschland).

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

PCR-Ansatz:

- 0,2 μ l Polymerase Taq (2 μ l bei BlueTaq)
- je 1 μ l Primer (for/rev) (Endkonzentration: 0,2 mM)
- 1 μ l dNTP-Mix (Endkonzentration: 0,2 mM)
- 3 μ l template (cDNA)
- 5 μ l Polymerase-Puffer
- 38,8 μ l HPLC-Wasser (37 μ l bei Blue Taq)

PCR-Programm:

| | | |
|-----------|-----------|---------------------------------|
| 94 °C | 10 min. | initiale Denaturierung |
| <hr/> | | |
| 40 Zyklen | | |
| 94 °C | 30 sec | Denaturierung |
| 50-60 °C | 30 sec | Annealing der Primer |
| 72 °C | 30-60 sec | Elongation |
| <hr/> | | |
| 72 °C | 10 min. | Fertigstellung der PCR-Produkte |

Tabelle 2-1: PCR-Programm

Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer, welche unterschiedlich ausfallen konnte. In der Regel lag sie bei 60 °C. Die Elongationsphase wurde je nach erwartetem Amplifikat gewählt (60 sec für 1 kb).

2.13.2.6 *Aufreinigung der PCR-Produkte*

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.13.3 *Klonierung von PCR-Produkten in einen Plasmidvektor*

Es wurde stets ein pGEM[®] -T Easy Vector System (Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt, um PCR-Produkte zu klonieren. Eine Abweichung zum bestehenden Protokoll war, dass statt der mitgelieferten Enzyme die T4 DNA-Ligase (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland, 5 WeissU/μl) mit dem dazugehörigen Puffer verwendet wurde. Die Menge des Vektors war 25 ng und die Ansatzgröße betrug 10 μl. Die Menge an PCR-Produkt wurde stets möglichst groß gewählt. Die Ligation erfolgte entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Nach erfolgter Ligation wurde der Ligationsansatz gereinigt/gefällt.

Fällung des Ligationsansatzes:

Ligationsansatz: 10 μl

1/10 Volumen Dialysepuffer

2-3 Volumen 100 %iges EtOH: bis 30 μl

2 h bei -20 °C fällen

Anschließend wurde 30 min. bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgehoben und verworfen. Das Pelett wurde in 50 μl 70 %igem EtOH gewaschen und nochmals 10 min. bei 14.000 rpm und diesmal bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pelett bei RT getrocknet und in 10 μl ddH₂O gelöst. Die Ligation wurde nun für die Transformation verwendet.

2.13.3.1 *Transformation von elektrokompenten Bakterienzellen*

Die Elektroporationsküvetten (71-2020, 25 x2 mm gap, PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) wurden zuvor 20-30 min. unter UV-Licht und vorbereitete IPTG/X-Gal Agar-Platten (mit Antibiotikum, siehe 2.15 Lösungen und verwendetes Material) zum Vorwärmen in den Wärmeschrank (Memmert Inkubator INB, Schwabach, Deutschland) gestellt. Gleichzeitig wurden Reaktionsgefäße mit 1 ml-L-Medium gefüllt und ebenfalls zum Vorwärmen in den Wärmeschrank (37 °C) gestellt (ohne Antibiotikum). Nach der Inkubationszeit der

Küvetten unter UV wurden diese auf Eis gestellt. 3 µl des Ligationsansatzes wurden mit 50 µl elektrokompetenten *E.coli* DH10B-Zellen (ElectroMAX™ DH10B™, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und in die Küvette gefüllt. Anschließend wurde eine Minute auf Eis inkubiert. Mit einem Elektroporator (Easyjec T Prima, EquiBio, PeqLab, Erlangen, Deutschland) wurde dann bei 2500 V für 5 ms die Transformation durchgeführt. Nach erfolgter Transformation wurde der Inhalt der Küvette mit etwas L-Medium gemischt und dann in ein Reaktionsgefäß mit vorgewärmten L-Medium überführt. Im Brutschrank wurde die Transformation schließlich für 30-45 min. inkubiert. 100 bzw. 200 µl eines Ansatzes wurde dann auf je eine vorgewärmte Agar-Platte ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank inkubiert.

2.13.3.2 Ansetzen von ÜberNacht-Kulturen „vermutlich“ positiver Klone

Nach der Über-Nacht Inkubation der Agar-Platten wurden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt, um das Koloniewachstum zu stoppen. Ein durch Blau-Weiß-Selektion (Winnacker,) als rekombinant ermittelter Klon wurde in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) mit 5 ml L-Medium überführt. Es folgte wieder eine Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (GFL 3031, Burgwedel, Deutschland) mit 120 U/min.

2.13.3.3 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation mit dem Kit GeneJET Plasmid Miniprep erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland). Abweichend davon wurde die Elution der Plasmide nicht mit Elution-Buffer sondern mit HPLC-Wasser durchgeführt. Diese Methode basierte auf der alkalischen Lyse (Birnboim *et al.*, 1979).

Nach der Plasmidpräparation wurde die Konzentration der Lösung mit einem Spektralphotometer (ND-1000, NanoDrop, Wilmington, CA, USA) ermittelt.

2.13.3.4 Restriktion

Der Restriktionsverdau wurde mit dem Enzym EcoRI (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Verdau wurde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Größe des Integrats zu bestimmen.

2.13.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Stimmte die ermittelte Integratgröße etwa mit der erwarteten Größe überein, wurde das Plasmid zur Sequenzierung an die Firma GENTERprise/Mainz übergeben. Die Sequenzierreaktion wurde nach dem Protokoll von Sanger et al., 1977 (modifiziert durch Prober et al., 1987) durchgeführt. Hierzu wurden 170-350 ng der Plasmid-DNA mit 1 µl T7-Primer (10 µM) versetzt und mit HPLC-Wasser auf 6 µl aufgefüllt (Protokoll nach <http://www.starseq.de>; Stand: 08.04.2009). Die so vorbereiteten Proben wurden zur weiteren Aufarbeitung der Firma GENTERprise/Mainz übergeben.

2.13.3.6 Auswertung der Sequenzdaten

Das Editieren der Sequenzdaten, welche durch GENTERprise/Mainz bereitgestellt wurden, geschah mit dem Programm FinchTV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>; Stand: 08.04.2009). Die Amplifikatsequenz wurde anschließend mit dem Programm Seq-Man (DNA-Star Inc., Madison, USA) zu der dazugehörigen Gensequenz aligned und verglichen.

2.13.4 Quantitative Real-Time RT-PCR

2.13.4.1 Durchführung der quantitativen Real-Time RT-PCR mit SYBR-Green

Die Genexpressionsmessungen wurden mit unterschiedlichen Geräten durchgeführt. Zum einen war dies das ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Cycler 7000) und das ABI Prism® 7500 FAST Sequence Detection System (Cycler 7500) (beide von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Das Auslesen der Daten geschah über die mitgelieferte Software Version 1.2.3 (Cycler 7000) und Version 1.4 (Cycler 7500) (Abb. 2-15). Für beide Cycler wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) verwendet.



Abbildung 2-14: ABI Detection System 7000 und 7500 FAST

Links im Bild dargestellt der ABI Detection System 7000 und rechts 7500 fast.

Für jeden Cycler wurde ein eigenes Protokoll (Reagenzien) und teils unterschiedliche Materialien verwendet, welche in den folgenden Tabellen zusammengestellt sind (Tabelle 2-2 und 2-3). Das Protokoll war bei beiden Geräten das gleiche (Tabelle 2-4).

| Material | Cycler 7000 | Cycler 7500 |
|------------------------|---|---|
| 96 Well Platten | 96 Well PCR Plate (4titude, Berlin, Deutschland) | 96 Well PCR Plate (Abgene, Hamburg, Deutschland) |
| Abdeckfolie | MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Darmstadt) | MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Darmstadt) |

Tabelle 2-2: Unterschiede in der Verwendung von Materialien

| Reagenzien für qRT-PCR/Ansatz | Cycler 7000 | Cycler 7500 |
|--|---------------------|---------------------|
| SYBR-Green | 12,5 µl | 5 µl |
| Primerkonzentration forward | 100 nM | 100 nM |
| Primerkonzentration reverse | 100 nM | 100 nM |
| HPLC-Wasser | 11 µl | 3,4 µl |
| Template | 1 µl (1:1 verdünnt) | 1 µl (1:1 verdünnt) |
| Gesamtvolumen Σ | 25 µl | 10 µl |

Tabelle 2-3: Protokolle für die verschiedenen Sequenz Detektion Systeme

qRT-PCR-Protokoll

| | | |
|------------------|---------------|---|
| 94 °C | 10 min. | initiale Aktivierung der Polymerase |
| <u>40 Zyklen</u> | | |
| 94 °C | 15 sec | Denaturierung |
| 60 °C | 30 sec | Annealing der Primer |
| <u>72 °C</u> | <u>30 sec</u> | <u>Elongation und Detektion der Fluoreszenz</u> |
| 60-95 °C | ~30 min | Erstellung der Dissoziationskurve |

Tabelle 2-4: qRT-PCR Programm

Die Dissoziationskurve dient der Überprüfung der Reaktion. Die Temperatur wird schrittweise von 60 auf 95 °C erhöht und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Schmelzen die PCR-Produkte auf, so wird das angelagerte SYBR-Green frei und es kommt zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Die Temperatur bei der die PCR-Produkte schmelzen ist charakteristisch. So kann anhand der Dissoziationskurve ermittelt werden, ob eine spezifische Reaktion stattgefunden hat. Ein zusätzlicher Qualitätstest wäre das Anfertigen eines Agarosegels, auf welchem nur eine Bande bei richtiger Größe zu detektieren sein sollte.

2.13.4.2 *Design spezifischer Primer*

Das Design der Primer ist essentiell für die qRT-PCR. Bei allen Untersuchungen wurden stets eigene Primer entworfen. Die Sequenzalignments sowie das Primerdesign wurden mit dem Programm Seqman (Lasergene Sequence Analysis Software, DNASTAR Inc., Madison, USA) angefertigt.

Vor dem Design der Primer wurde die kodierende Sequenz (CDS) und die Exonsequenzen heruntergeladen und zueinander aligned. Die designeten Primersequenzen umfassten 17-25 Basen und lagen immer am 3'-Ende der CDS. Die Primerlänge richtete sich nach der Schmelztemperatur, die bei ~ 60 °C liegen sollte. Ebenso sollte sich der GC-Gehalt um die 50% bewegen. Das Primerpaar sollte einen Bereich von 80-150 Basenpaare umspannen. Hierbei sollte ein Primer eine Exon-Intron-Grenze überspannen. Die Wahl der Primersequenzen sollte die Amplifikation der genomischen DNA während der Messung verhindern. War dies nicht möglich (nur ein Exon), wurde mit den Primern eine PCR mit RNA als Template durchgeführt, um die Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Wenn dies nicht der Fall war, konnten die Primer bedenkenlos eingesetzt werden. Die Qualitätskontrolle der Primer wurde mit Hilfe von online-Tools vorgenommen (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html> →

Kontrolle der Schmelztemperatur und GC-Gehalt; Stand: 08.04.2009) und (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> → Überprüfung der Selbstkomplementarität und Bildung von Primerdimeren). Nachdem die Primer alle Qualitätskriterien erfüllt haben, wurden die Sequenzen noch mit Hilfe eines BLAST-Algorithmus (NCBI, Bethesda, USA; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Stand: 08.04.2009) überprüft. In Einzelfällen wurde das Primerpaar in das 3'-UTR gelegt, wenn entweder keine positive PCR mit dem herkömmlichen Primerdesign möglich war, oder die Target-Sequenz des Mikroarrays im 3'-UTR lag.

2.13.4.3 Der Amplifikationsplot



Abbildung 2-15: Amplifikationsplot

Der Amplifikationsplot ist die Darstellungsform der Messung durch qRT-PCR. Dabei wurde der Logarithmus der Fluoreszenzintensität (y-Achse) gegen die Zyklenzahl (x-Achse) aufgetragen. Der gezeigte Plot ist von dem Globin Cytoglobin_15.02.2007.

Die Messung durch qRT-PCR wird mittels eines Amplifikationsplots visualisiert (Abb. 2-15). Dieser besteht aus den logarithmischen Fluoreszenzintensitäten und der Anzahl der PCR-Zyklen. Wichtig ist, vor der Auswertung des PCR-Laufs die Baseline (Grundlinie) festzulegen. Die Baseline umfasst alle Zyklen, in welchen noch keine messbare Änderung in der Fluoreszenzintensität vorliegt. Der so ermittelte Wert legt das Hintergrundrauschen fest und wird von den Messwerten abgezogen. Der Threshold (Schwellenwert) definiert den Grenzwert/Schwellenwert, bei dem die Messung des Fluoreszenzwerts stattfindet. Der Threshold wurde so gewählt, dass er sich im linearen Bereich aller Kurven (exponentielle Phase) befindet. Überschreitet ein Fluoreszenzwert diesen Threshold, so wurde der PCR-Zyklus als ct-Wert (ct =

Cycle of Threshold) definiert. Die Menge an Nukleinsäure in der Probe kann mit Hilfe des ct-Wertes ermittelt werden. Der ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zur Menge an PCR-Produkt. Das Mitführen von Standardplasmiden in der qRT-PCR ermöglicht es, die absolute Quantität der unbekanntenen Proben zu bestimmen.

2.13.4.4 Auswertung der Q-PCR anhand von Standardplasmiden

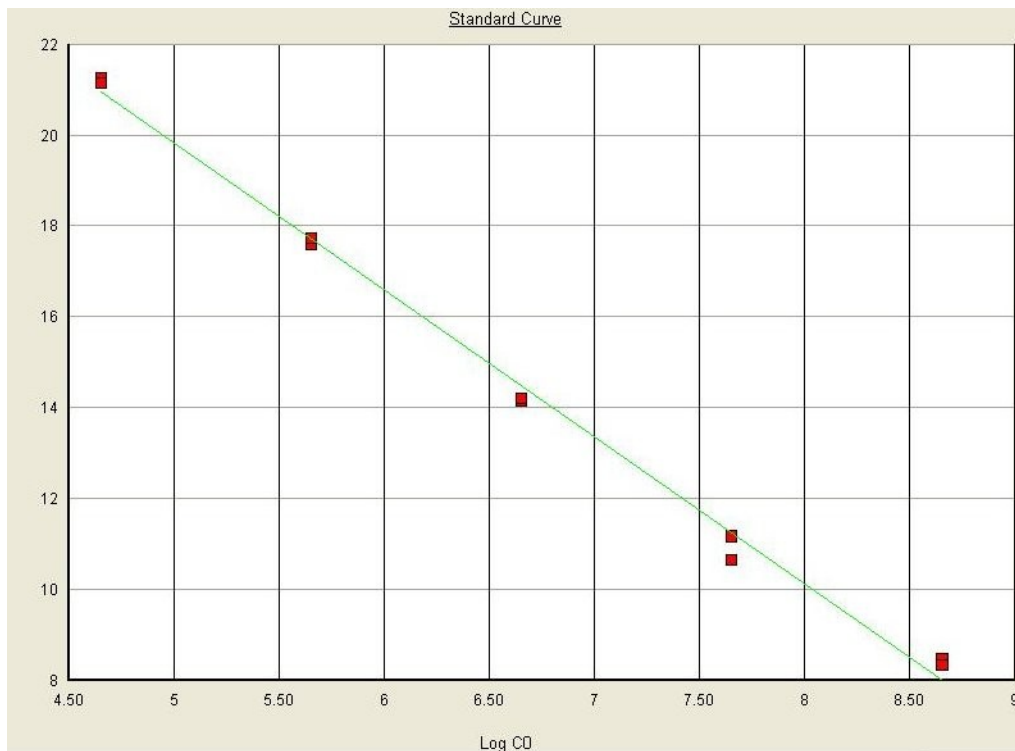


Abbildung 2-16: Standardgerade eines qRT-PCR-Laufs

Abgebildet ist die Standardgerade des Cytoglobin-Laufs von Abb. 14.

Das Mitführen von Standardplasmiden macht eine absolute Quantifizierung der unbekanntenen Nukleinsäuremenge möglich. Die grafische Darstellung der Standardgerade geschieht über das Auftragen des Logarithmus der Plasmidkonzentration gegen den Zyklus indem der Fluoreszenzwert den determinierten Threshold überschreitet (Abb. 2-16).

Die Standardgerade macht auch eine Beurteilung über die Qualität des Laufs möglich. Hierzu werden Geradensteigung (engl. „slope“), Achsenabschnitt (engl. „Intercept“) und der R^2 -Wert herangezogen. Die Geradensteigung [Effizienz $E = (10^{(-1/\text{Steigung})}) - 1$] gibt über die PCR-Effizienz Auskunft. Liegt eine PCR-Effizienz von 100% vor, so verdoppelt sich in jedem Zyklus die Menge der PCR-Produkte. Daraus folgt dann eine Steigung von -3,3. Die Steigung sollte bei den Messungen einen Wert von -3,3 bis -3,8 haben.

Der Intercept beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem gerade noch eine Kopie des zu messenden Produkts detektiert werden würde.

Der Wert R^2 gibt das Quadrat des Regressionskoeffizienten an, der besagt wie gut die Daten in die Reihe passen. Dieser Wert sollte nahe bei 1,0 liegen. Als Schwellenwert in dieser Arbeit wurde der Wert 0,98 definiert. Sind all diese Qualitätsstandards erfüllt, kann die Standardgerade dazu verwendet werden, die unbekannte Menge an Nukleinsäure in verschiedenen Proben zu bestimmen.

Damit die Kopienzahl möglichst genau bestimmt werden kann, wurde stets eine Verdünnungsreihe der Plasmide auf einer Platte mitgeführt. Dabei fanden Verdünnungen von 10^3 - 10^7 Kopien/ μ l Verwendung. Die Korrektheit der erhobenen Daten wurde gewährleistet, indem immer zwei (Duplets) Standardproben nebeneinander aufgetragen wurden. Diese sollten im Amplifikationsplot möglichst deckungsgleich sein. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle mitgeführt (NTC – engl. No Template Control), um das saubere Arbeiten zu belegen.

Bevor eine Standardreihe allerdings zu den Proben mit auf die Platte aufgetragen wurde, musste ein Test gemacht werden. Hierzu wurde wie beim tatsächlichen Lauf eine Standardreihe angelegt und die Fluoreszenzintensitäten gemessen. Waren die Qualitätsstandards erfüllt (siehe oben), konnte dieses Plamid zur Messung eingesetzt werden.

2.13.4.5 Normalisierung der Messdaten und Auswertung

Die Extraktionsmethoden von RNA sind mittlerweile standardisiert. Dennoch kann es bei der RNA-Extraktion zu unterschiedlichen Ausbeuten kommen. Des Weiteren kann es bei der cDNA-Synthese zu Unterschieden kommen. Daher müssen die ermittelten Expressionswerte normalisiert werden. Dies geschah über die Messung von sogenannten Referenzgenen (Vandesompele *et al.*, 2002). Da es bisher keine Daten über den Einfluss von Ultraschall auf die Genexpression gab, wurden 5 bekannte Referenzgene (*β -actin*, *albumin*, *ARP*, *Cyclophilin A* und *GAP-DH*) mittels qRT-PCR gemessen und die besten aus dieser Reihe ausgewählt. Die Eignung der Referenzgene wurde mit einem Makro von Excel (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; Stand: 08.04.2009) bestimmt. Hierbei wurden die Expressionsdaten aller Proben in eine Excel-Matrix eingetragen. Der ermittelte Stabilitätswert M gab an, welche Referenzgene sich am besten eignen. Der qRT-PCR-Messwert einer Probe wurde schließlich durch den dazugehörigen Normalisierungsfaktor dividiert.

Die Expressionsdaten wurden aus dem Programm SDS extrahiert und unter dem Format .csv gespeichert. Dieses Dateiformat kann unter Änderung von ein paar Einstellungen in eine Excel-

Matrix importiert und ausgewertet werden. Die Korrekturfaktoren wurden mit Hilfe des Excel-Makros (geNorm) bestimmt (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>; Stand: 08.04.2009). Hierzu wurden die absoluten Expressionswerte (ermittelte Kopienzahl) wie vorgegeben in ein Excel-Tabellenblatt eingetragen. Nachdem die Stabilität der gemessenen Referenzgene bestimmt wurde, gab das Makro zusätzlich eine Empfehlung über wie viele Gene zu normalisieren ist.

2.14 MikroArray Analysen

2.14.1 Auswahl der Proben

Zur tiefgründigen Untersuchung der globalen Genexpression wurden einige Proben ausgewählt, um diese mit der Mikroarray Technik zu untersuchen. Die Auswahl der Proben geschah nach 10 qRT-PCR-Messungen. Die Probe, welche sich nach diesen 10 Messungen am meisten nahe des Mittelwerts in seiner Expression befand, wurde für die Mikroarray-Analyse ausgewählt. Hierzu wurde die RNA mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Karlsruhe, Deutschland) nochmals auf Reinheit geprüft.

Folgende Proben wurden ausgewählt: US-PR052, 067, 071, 072, zusätzlich wurden Proben von US-PR106 und 094 verwendet

2.14.2 cDNA-Synthese und Markierung

Die cDNA-Synthese und Markierung wurde mit dem SuperScript Plus Indirect cDNA Labeling Kit, Version C (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt.

20 µg Gesamt-RNA wurden pro Probe eingesetzt und mit Oligo(dT)₂₀ Primern versetzt. Die Kopplung mit den Farbstoffen Alexa555 und Alexa647 geschah über Nacht bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde immer gleichzeitig für die beschallte und die Vergleichsprobe durchgeführt. Zur Validierung der Ergebnisse wurde ein „Dye-Swap“ durchgeführt, was bedeutet, dass eine Probe mal mit einem und ein anderes Mal mit dem anderen Farbstoff markiert wurde. Dies wurde durchgeführt, da die Fluoreszenz des roten Farbstoffes meist schwächer ist, als die des grünen und es so leicht zu Artefaktbildung kommt (Dabney *et al.*, 2006).

2.14.3 Hybridisierung der Mikroarrays

Die Experimente wurden mit Mikroarrays von Operon (OPRNV3_05, Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland) durchgeführt. Die Verum- und Kontrollprobe wurden zusammen mit

180 µl Hyb-Puffer (OPHYB-1, Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland) auf den Chip gegeben und für 16 h bei 42 °C inkubiert/hybridisiert. Die Hybridisierungen wurde an drei unterschiedlichen Geräten durchgeführt (Tabelle 2-5).

Abweichend von den Herstellerangaben wurde an dem Hybridisierungsgerät Lucidea Slide Pro (GE Healthcare, München, Deutschland) ein Waschschrift mit SSPE-Puffer (1 x) durchgeführt. Nach dem Waschschrift wurde die markierte cDNA über den SSPE-Puffer auf die Chips gegeben. Weitere Protokollmodifikationen fanden an den Hybridisierungstationen von GeneTac (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) und a-Hyb (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) statt. Das Hybridisierungsprotokoll wurde an die jeweiligen Geräte angepasst. Zusätzlich wurden die Chips an der a-Hyb Station nach den Waschschriften herausgenommen und mit Stickstoff getrocknet bevor sie gescannt wurden. Ebenfalls wurde an der a-Hyb der Pre-Hybridisierungspuffer der Firma Miltenyi verwendet.

| Hybridisierungsstation | Scanner | Puffer und Lösungen | Anzahl Chips | verwendete Probe | Bezeichnung des Arrays |
|------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Lucidea Slide Pro | Scanarray Express | Operon Buffer Kit | 4 Chips mit Dye Swap | US/Kontrolle nach 4 h | LSP-1+2 |
| | | | | US/Kontrolle nach 24 h | LSP-3+4 |
| Gene Tac | Gene Tac LS IV | Operon Buffer Kit | 1 Chip | US/Kontrolle nach 4 h | GT-1 |
| a-Hyb | Miltenyi Scanservice | Operon Buffer Kit | 1 Chip | Ischämie/nativ | Isch-1 |
| a-Hyb | Miltenyi Scanservice | Operon Buffer Kit | 4 Chips mit Dye Swap | US/Kontrolle nach 4 h | aH1+2 |
| | | | | US/Kontrolle nach 24 h | aH3+4 |

Tabelle 2-5: Durchgeführte Versuche mit den Operon Chips

Es wurden verschiedene Geräte und Proben getestet, um die Ergebnisse zu optimieren.

2.14.4 Auswertung der Arrays

Nach der Hybridisierung der Chips wurden diese nach Herstellerangaben mit der Herstellersoftware gescannt (Scannerzuteilung: siehe Tabelle 5). Die Auflösung betrug 10 µm und wurde im *.tif-Format gespeichert. Die Anregungsintensität wurde manuell eingestellt und den jeweiligen Fluoreszenzintensitäten angepasst. Die Auswertung wurde mit den Programmen GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und Scanarray Express (PerkinElmer, Waltham, USA) angefertigt. Beide Programme machten die Zuordnung der Spots zu den jeweiligen Genen möglich und wandelten die Daten in eine *.gpr-Datei um, welche in Excel

(Microsoft) importiert werden konnte. Die gesamten Rohdaten sind im digitalen Anhang aufgelistet. Die Arrays Isch1 und aH3+4 wurden durch den Miltenyi Scanservice an einem Scanner der Firma Agilent gescannt und die Rohdaten an uns geschickt.

Folgende Qualitätsmerkmale mussten von den Chips erfüllt sein:

| Parameter | Schwellenwert |
|--|---------------|
| Quotient der Mediane des Verhältnisses Signal/Hintergrund | >10 |
| Mittelwert der Mediane der Intensität des lokalen Hintergrundes aller Spots | <500 |
| Quotient der Mediane des Verhältnisses Signale/Rauschen | >10 |
| Prozentualer Anteil der Mediane aller Spots größer als das Hintergrundsignal + einfache Standardabweichung [%] | 90 |
| Varianz der Spots | <0,5 |
| Varianz des Hintergrundes | <0,5 |
| Anteil der gesättigten Spots [%] | <1 |
| nicht gefundene Spots [%] | <7 |
| Anteil der schlecht markierten Spots [%] | <7 |

Tabelle 2-6: Qualitätskontrolle mit Software GenePix

Als Kontrolle diente die Fluoreszenz der Negativkontroll-Spots. War die Intensität eines Spots geringer als die mittlere Intensität einer solchen Negativkontrolle plus eines gewählten Schwellenwerts, wurde er verworfen. Ein weiteres Qualitätskriterium war der Median des lokalen Hintergrunds plus der einfachen Standardabweichung. War die Intensität eines Spots geringer als das 1,5 fache diesen Werts, so wurde er für die weitere Analyse nicht in Betracht gezogen. Im Gegensatz dazu wurden alle Spots bei denen sich mehr als 10% der Pixel über der Sättigung befanden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Alle Spots, die in beiden Kanälen alle Qualitätskontrollen bestanden, wurden analysiert. Eine zusätzliche Normalisierung der Daten fand nicht statt.

Die statistische Auswertung wurde mit Excel vorgenommen. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem t-test (zwei nicht verbundene Stichproben) ermittelt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde 5% gewählt (p-value = 0,05). Die Kennzeichnung der signifikanten Ergebnisse wurde in den Grafiken mit (*) angezeigt.

2.14.5 HDMA Core-Facility

Ein weiterer Zweig der Mikroarray Analysen wurde von der HDMA Core-Facility angefertigt. Die RNA stammte aus den laufenden Versuchen und die Auswahl war mit denen aus den anderen Mikroarrayuntersuchungen identisch (siehe 2.13.1 Auswahl der Proben). Vor dem Hybridisieren der Chips wurde die RNA an der HDMA Core-Facility abgegeben und mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Karlsruhe, Deutschland) untersucht. Nach erfolgter RNA-Kontrolle wurden die cRNA-Sonden hergestellt und ebenfalls mit dem Bioanalyzer 2100 auf Qualität überprüft. Dem folgte die Hybridisierung der Affymetrix Chips Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Ltd., Santa Clara, USA). Im Gegensatz zu den Operon Arrays wurde hier kein Dye Swap gemacht, sondern die einzelnen Proben auf einen Chip hybridisiert. Ein Dye Swap war nicht nötig, da die Validität der Affymetrix Arrays durch interne Kontrollen so hoch ist, dass ein Dye Swap entfallen konnte.

Die vorausgewerteten Daten der Analyse wurden nach erfolgtem Scan in Form eines Excel Sheets zur Verfügung gestellt. Alle Regulationen, welche nicht mehr als 2 fach waren, wurden nicht in den Ergebnisteil aufgenommen.

Das Excel-Dokument enthielt die Probe Set ID, welche über eine Internet Plattform von Affymetrix (<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>; Stand: 08.04.2009) dekodiert werden konnte.

2.15 Lösungen und verwendetes Material

DEPC-Wasser:

- 1 l ddH₂O
- 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)
- 12 h schütteln bei 37 °C
- dann autoklavieren

RNA-Formaldehyd-Gel:

- 0,3 g Agarose + 22,5 ml DEPC-Wasser
- aufkochen
- + 3 ml 10 x MOPS-Puffer
- in 60 °C Wasserbad equilibrieren
- + 4,5 ml Formaldehyd (leicht schwenken)
- 2 Gele gießen

TBE-Puffer:

- 90 mmol Tris
- 90 mmol Borsäure
- 1,25 mmol Na₂EDTA

L-Medium

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- in 1000 ml Aqua bidest.
- autoklavieren

Phosphatpuffer

- Puffer 1: 0,1 mol NaH₂HPO₄xH₂O
- Puffer 2: 0,1 mol Na₂HPO₄x2H₂O
- pH 7,4 des Puffers 2 mit Puffer 1 einstellen

MOPS-Puffer (10x):

- 0,2 M 3-(N morpholin)-Propan-Sulfonsäure
- 0,05 M Na-Acetat
- 0,01 M Na₂EDTA pH 7,0

Agarose-Gel

- 1-2% Agarose in 1x TBE-Puffer

RNA-Dye:

- 50 % Glycerin
- 0,001 M Na₂EDTA pH 8,0
- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylencyanol FF

Agar-Platten

- 15 g Agar-Agar in 1000ml L-Medium
- Ampicilin 100 mg/ml (AppliChem, Ampicilin Natriumsalz)
- 0,2 % IPTG (Fermentas, St.Leon-Rot)
- 0,05 % X-Gal (Fermentas, St.Leon-Rot)

SSPE-Puffer (20x):

- 175,3 g NaCl
- 27,6 g NaH₂PO₄
- 9,4 g EDTA
- mit 10N NaOH aufpH – 7,4 einstellen und anschließend autoklavieren

Dialysepuffer (1x)

- 0,025 M Tris
- 0,3 M NaCl
- 0,01 M Na₂EDTA

3 Ergebnisse:

3.1 Wirkung von 60 kHz Ultraschall auf ischämisches Hirngewebe

Es wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen:

| | | |
|-----------------|---|-------|
| Gruppe 1 | Fadenmodell mit Reperfusion und Ultraschallbehandlung | n = 8 |
| Gruppe 2 | Fadenmodell mit Reperfusion ohne Ultraschallbehandlung | n = 8 |
| Gruppe 3 | Fadenmodell mit permanentem Verschluss und Ultraschallbehandlung | n = 8 |
| Gruppe 4 | Fadenmodell mit permanentem Verschluss ohne Ultraschallbehandlung | n = 8 |
| Gruppe 5 | Messung der intrakraniellen Temperatur während der Beschallung (Intervallprotokoll) | n = 3 |
| Gruppe 6 | Messung der intrakraniellen Temperatur während einer 60 minütigen Dauerbeschallung | n = 3 |

Tabelle 3-1: Gruppeneinteilung der 60 kHz Studie

Insgesamt sechs Versuchsgruppen lassen sich in drei Untergruppen unterteilen. Eine Untergruppe wurde mit dem Reperfusionsmodell behandelt, eine weitere mit dem permanenten Okklusionsmodell und die letzte Untergruppe wurde mit unterschiedlichen Schallmodi behandelt und die intrakranielle Temperatur ermittelt. Alle Tiere der Gruppen 1-4 erhielten zusätzlich rt-PA.

3.1.1 Ziel der Studie

Niederfrequenter Ultraschall hat sich *in vitro* als sehr effektiv bei der Lyse von Blutgerinnseln erwiesen (Nedelmann *et al.*, 2005). Im *in vivo* Einsatz einer 20 kHz Sonde an gesunden Ratten konnte dosisabhängige Nebenwirkungen beschrieben werden (Schneider *et al.*, 2006), die sich gleichzeitig aber in geringeren Intensitätsstufen nicht zeigten. Der Einsatz dieser vermeintlich sicheren Einstellung führte dann im Ischämieversuch allerdings zu einer erhöhten Mortalitätsrate der Tiere (Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007). Es war folglich von unerwünschten Wirkungen auszugehen, die sich in besonderem Maße auf das ischämisch vorgeschädigte Gehirn auswirken. Diese Studie wurde entworfen, um Bioeffekte von 60 kHz Ultraschall auf das ischämische Gehirngewebe zu untersuchen. Im Falle von unerwünschten Wirkungen sollten diese näher charakterisiert werden. Dies ist für das Verständnis der durch Ultraschall verursachten Effekte und für die weitere Entwicklung der Sonothrombolyse von Bedeutung. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Beschallung des ischämischen Gewebes einen Einfluss auf die intrakranielle Temperatur hat. Da Sicherheitsaspekte bei dieser Studie im Vordergrund standen, wurde aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit das Fadenmodell verwendet. Die

Leistung des Ultraschallgerätes wurde auf $0,2 \text{ W/cm}^2$ eingestellt und der Duty Cycle auf 50% festgelegt. Die Repetitionsfrequenz war 10 Hz.

3.1.2 Auswertung der Daten

3.1.2.1 Neurologische Auswertung

Ein signifikanter Unterschied in der neurologischen Beurteilung konnte zwischen den Gruppen 3 und 4 mit permanenter Okklusion festgestellt werden ($p = 0,01$). In den Gruppen mit permanenter Okklusion und Ultraschallbehandlung war das neurologische Defizit signifikant erhöht im Vergleich zur schein-beschallten Gruppe (Abb. 3-1). In den Reperfusiongruppen hingegen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

In der Auswertung der einzelnen Items des Neuro Scores zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen insbesondere in Bezug auf das Hörvermögen, so dass hier von einer spezifischen Nebenwirkung des Ultraschalls auszugehen ist (Abb. 3-2).

3.1.2.2 MRT-Auswertung

Das Läsionsvolumen wurde mit einer T2-Sequenz (MRT) ermittelt. Bei Ultraschallbehandlung nach Reperfusion zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme des ischämischen Läsionsvolumens ($p < 0,05$). Im Vergleich hierzu zeigte sich bei permanenter Okklusion bei beschallten und bei nicht behandelten Tieren kein Unterschied im Läsionsvolumen (Abb. 3-3).

3.1.2.3 Mortalitätsrate

Bei der Durchführung der Versuche fiel auf, dass es Unterschiede in der Mortalitätsrate zwischen den Gruppen gab. In der beschallten Versuchsgruppe mit permanentem Verschluss lag die Mortalitätsrate signifikant höher als in der dazugehörigen Placebogruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen mit Reperfusion war nicht signifikant (Abb. 3-4).

3.1.2.4 Intrakranielles Temperaturmonitoring während der Ultraschallbehandlung

Eine mögliche Nebenwirkung des Ultraschalls ist die thermische Wirkung. Daher wurde zusätzlich zu den Versuchsreihen mit permanentem Verschluss und Reperfusion eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der während der Beschallungsphase die intrakranielle Temperatur gemessen wurde. Dies geschah zeitgleich mit der Ultraschallbehandlung im Anschluss an eine 90minütige Okklusion. Unterschieden wurden zwei Behandlungsmodi. Zum einen wurde Dauerschall eingesetzt, zum anderen das gleiche Intervallprotokoll wie bereits unter 2.4 beschrieben.

Abbildung 3-5 veranschaulicht graphisch die Temperaturkurven beider Anwendungen. Unter dem verwendeten Intervallprotokoll kam es zu keinem relevanten Anstieg der intrakraniellen Temperatur. Offenbar führen die Schallpausen dazu, dass sich keine erhöhte Temperatur entwickeln kann. Nach kontinuierlicher Behandlung kam es zu einer Temperaturerhöhung mit durchschnittlichen Werten um die 2°C.

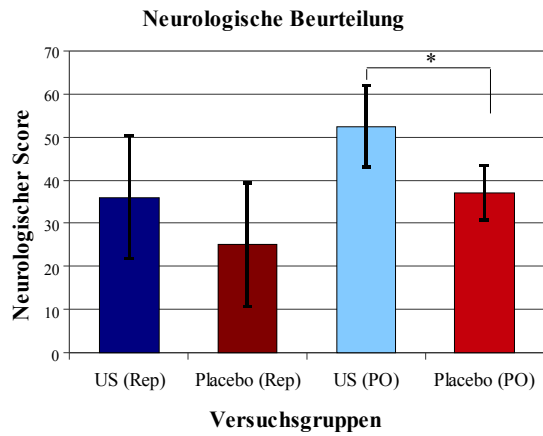


Abbildung 3-1

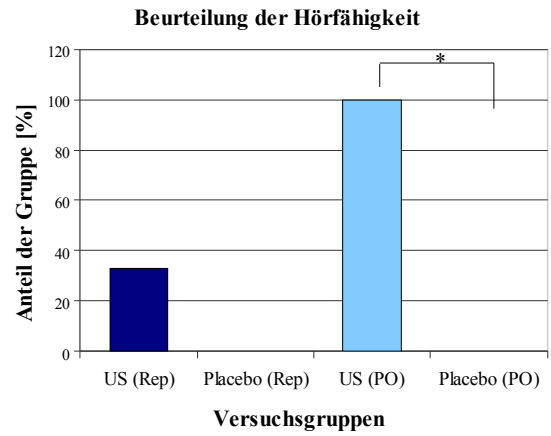


Abbildung 3-2

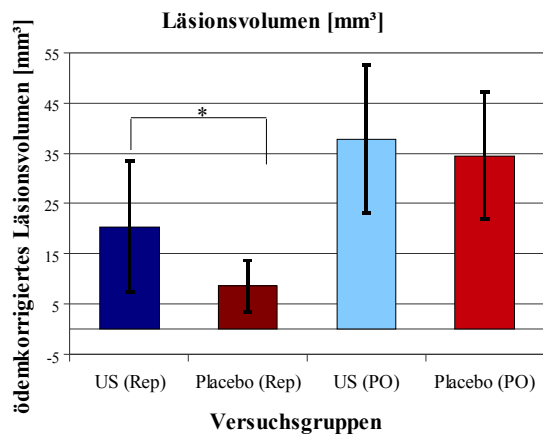


Abbildung 3-3

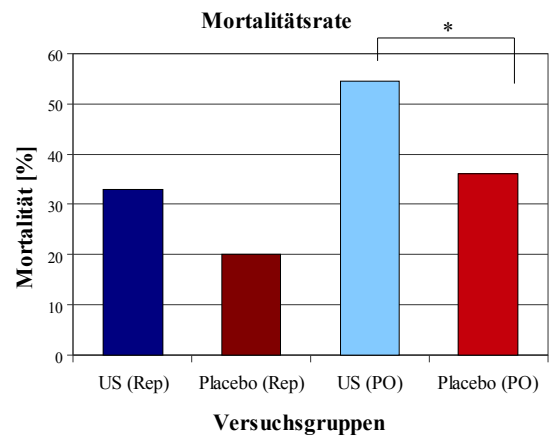


Abbildung 3-4

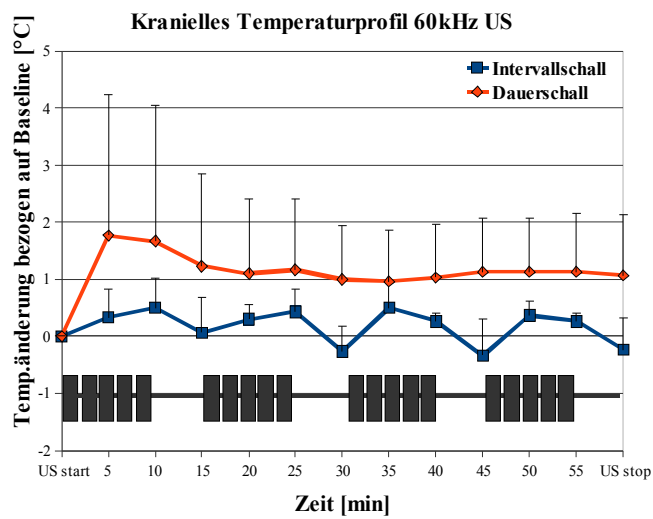


Abbildung 3-5

Abbildung 3-1: Neurologische Beurteilung nach 24 h

Die Neurologische Beurteilung der Tiere nach 24 h ergab ein signifikant schlechteres Ergebnis der beschallten Tiere mit permanentem Verschluss im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (* $p = 0,01$). Der Vergleich der Reperfusiongruppen untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied (US = Ultraschall; Rep = Reperfusion; PO = permanente Okklusion).

Abbildung 3-2: Einfluss der Ultraschallbehandlung auf die Hörfähigkeit

Die Ultraschall-behandelten Gruppen zeigten einen Verlust des Hörvermögens, so dass einige (in der Reperfusiongruppe) oder sogar alle Tiere (in der Gruppe mit permanenter Okklusion) schwerhörig waren. In der Gruppe mit permanentem Verschluss war dieser Unterschied signifikant im Vergleich zur Schein-behandelten Gruppe (* $p < 0,0001$) (US = Ultraschall; Rep = Reperfusion; PO = permanente Okklusion).

Abbildung 3-3: ödemkorrigiertes Läsionsvolumen ermittelt durch MRT-Messung

Nach der Ultraschallbehandlung (US) in der Reperfusiongruppe (Rep) erhöhte sich das Läsionsvolumen signifikant im Vergleich zur Placebogruppe (* $p < 0,05$). Die Gruppe mit permanentem Verschluss (PO) zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Abbildung 3-4: Mortalitätsrate der Versuchsgruppen

Die Mortalitätsrate in der beschallten Gruppe (US) mit permanentem Verschluss (PO), war signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen Placebogruppe (* $p < 0,05$). Der Unterschied zwischen den Reperfusiongruppen (Rep) hingegen war nicht signifikant.

Abbildung 3-5: Kraniales Temperaturprofil verschiedener Schallmodi

Die Grafik zeigt die kraniale Temperaturänderung bezogen auf die gemessene Baseline. Unter den Kurven ist grafisch das unter 2.4 genannte Intervallprotokoll dargestellt, das für die Intervallbehandlung (blaue Kurve) verwendet wurde. Hierbei ist auffällig, dass es stets nach einem Ultraschallblock zu einem promptem Rückgang der Hirntemperatur kommt. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich mit der Kurve der Dauerschalltiere.

3.1.2.5 *Histologische Auswertung*

Zur Darstellung der Blutungen (Subarachnoidale und intrakranielle Blutungen) wurde eine HE-Färbung verwendet. Hämorrhagische Transformationen wurden mit Hilfe der Trichromfärbung dargestellt. In zwei Fällen wurden intrazerebrale Mikroblutungen identifiziert. Beide Tiere waren zuvor mit Ultraschall behandelt worden. Eines aus der Reperfusiongruppe und das andere aus der Gruppe mit permanenter Okklusion (Abb. 3-6). Des Weiteren wurden vier Tiere mit subarachnoidalen Blutungen identifiziert. Jeweils zwei Tiere in jeder ultraschallbehandelten Gruppe. Hämorrhagische Transformationen wurden in zwei Tieren nach permanenter Okklusion identifiziert. Davon war eines in der behandelten und eines in der schein-behandelten Gruppe.

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 3-7).

Abbildung 3-6: Zerebrale Blutungen und subarachnoidale Blutungen

Die Bilder a und b zeigen zwei Beispiele intrazerebraler Blutungen nach Ultraschallbehandlung (HE-Färbung). Diese Blutungen traten auf beiden Hemisphären auf. Ein Tier zeigte zusätzlich eine subarachnoidale Blutung (SAB) (siehe Pfeil). Des Weiteren zeigten sich hämorrhagische Transformationen sowohl in beschallten (c) als auch in nicht beschallten (d) Tieren (Trichrom-Färbung). (Abbildung: Abteilung für Neuropathologie/Mainz).

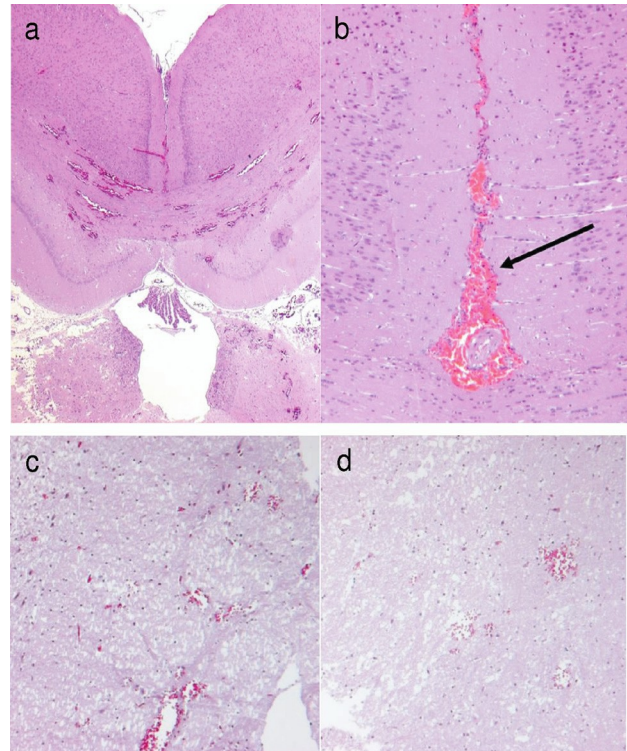
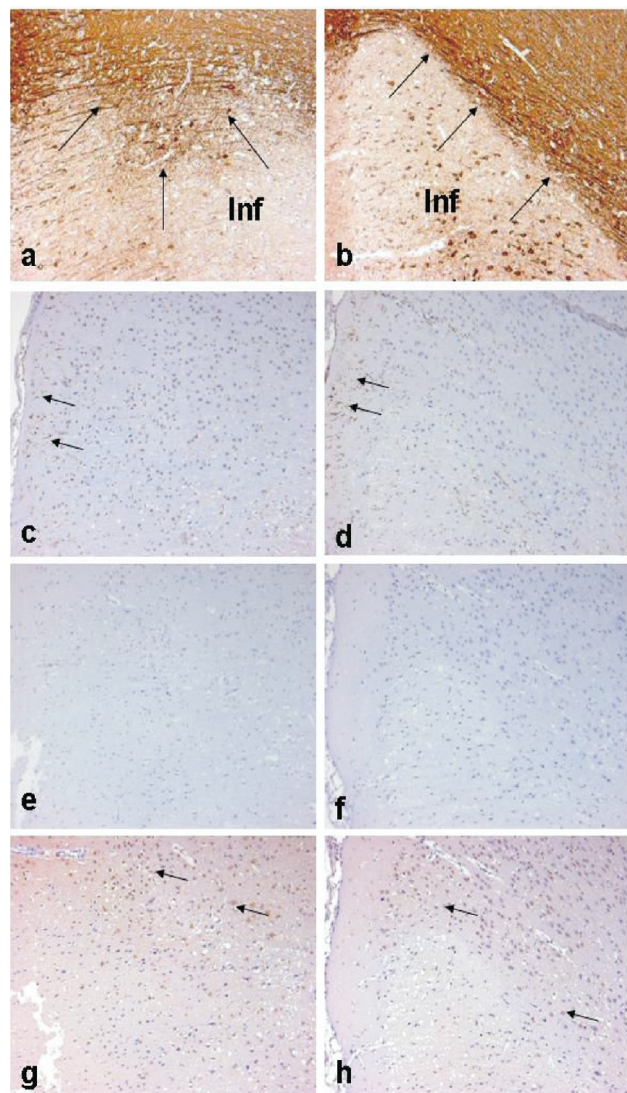


Abbildung 3-7: Repräsentative, immunhistochemische Färbungen verschiedener Schnitte

Auf der linken Seite befinden sich Schnitte von ultraschallbehandelten Tieren und auf der rechten Seite Kontroll-Tiere. Abbildung a und b zeigt eine Immunfärbung mit MAP2, in der die Grenze zwischen Nicht-Infarkt und Infarktareal (siehe Pfeile) deutlich sichtbar ist (Inf – Infarkt). Bilder c und d zeigen eine GFAP Immunfärbung. Hier werden einige immunreaktive Astrozyten nahe des Kortex sichtbar (siehe Pfeile). In Bild e und f sind Schnitte mit CD68 gezeigt. Diese Färbung richtet sich gegen Makrophagen und Mikroglia. Keine markierten Zellen konnten detektiert werden. Der Transkriptionsfaktor c-fos ist in den Bildern g und h immunhistochemisch gefärbt worden. Einige gefärbte Zellen sind in der Peri-Infarkt-Zone sichtbar geworden. (Abbildung von Abteilung für Neuropathologie/Mainz)



3.2 Einfluss der Duty Cycles-Einstellung auf das Auftreten unerwünschter Therapieeffekte

3.2.1 Versuchsaufbau

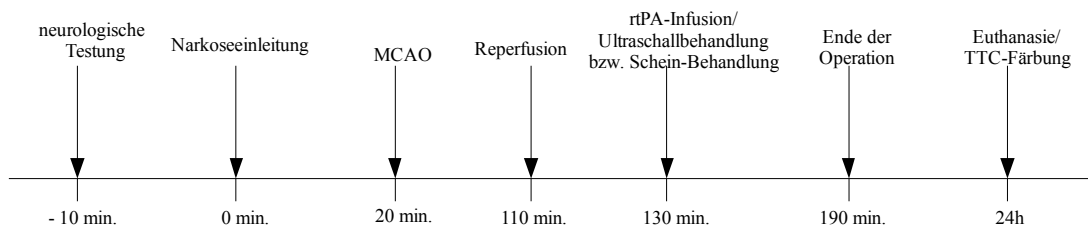


Abbildung 3-8: Versuchsablauf Duty Cycle Studie

Vor Durchführung der Okklusion wurden die Tiere neurologisch getestet. Neunzig Minuten nach der Okklusion wurde eine Reperfusion durchgeführt und eine Ultraschallbehandlung/Scheinbehandlung angeschlossen. Vierundzwanzig Stunden nach der Okklusion fand die Euthanasie der Tiere mit anschließender TTC-Färbung der Gehirne statt.

| | | |
|-----------------|---|-------|
| Gruppe 1 | Schallgruppe mit 0,05 W/cm ² und einem Duty Cycle von 20% | n = 8 |
| Gruppe 2 | Schallgruppe mit 0,1 W/cm ² und einem Duty Cycle von 20% | n = 8 |
| Gruppe 3 | Schallgruppe mit 0,1 W/cm ² und einem Duty Cycle von 80% | n = 7 |
| Gruppe 4 | Schallgruppe mit 0,1 W/cm ² und einem Duty Cycle von 100% (cw) | n = 8 |
| Gruppe 5 | Kontrollgruppe mit Scheinbeschallung | n = 9 |

Tabelle 3-2: Gruppeneinteilung der Duty Cycle-Studie

Die Tiere wurden in fünf verschiedene Gruppen unterteilt, die mit unterschiedlichen „Duty Cycles“ (DC) und Leistung (0,05 W/cm² mit 20% DC; 0,1 W/cm² mit 20% DC; 0,1 W/cm² mit 80% und 0,1 W/cm² mit 100% DC also cw-“continuous wave“) behandelt wurden. Die fünfte Gruppe wurde als Kontrollgruppe einer Okklusion unterzogen, erhielt allerdings nur eine Scheinbehandlung.

Alle Tiere erhielten 10 mg/kg KG rt-PA i.v. während der Beschallung (60 min.).

HNO-Studie:

Die Tiere dieser Studie waren vor der Ultraschallbehandlung unbehandelt. Im Gegensatz zu den Tieren der vorangegangenen Gruppen erhielten sie keine zerebrale Ischämie.

| | | |
|-----------------|---|-----|
| Gruppe 6 | Schallgruppe mit 0,2 W/cm ² und einem Duty Cycle von 50% | n=6 |
| Gruppe 7 | Schallgruppe mit 0,1 W/cm ² und einem Duty Cycle von 80% | n=6 |
| Gruppe 8 | Sham Gruppe, die lediglich eine Stunde in Narkose lag | n=6 |

Tabelle 3-3: Gruppeneinteilung HNO Studie

Für die AEP-Messung (AEP-Akustisch evozierte Potentiale) wurden die Tiere in drei Versuchsgruppen unterteilt. Eine Gruppe wurde mit der Ultraschalleinstellung wie aus der 60 kHz Studie (Kapitel 3.2) behandelt, eine Gruppe wie in der Duty Cycle Studie (Kapitel 3.3) und eine letzte Gruppe wurde scheinbehandelt.

AEP-Messung:

Die Messung der akustisch evozierten Potentiale (AEP) fand jeweils vor der und 24 h nach der Beschallung/Sham-Beschallung statt.

3.2.2 Ziel der Studie

Für die resultierende Charakteristika eines Schallfeldes und damit für die Art der resultierenden Bioeffekte spielen zahlreiche technische Ultraschallparameter eine Rolle. Hierzu gehört neben der Intensität in besonderem Maße auch der Duty Cycle als Maß des Puls-Pause-Verhältnisses bei gepulster Anwendung. In dieser Studie wurde die Wirkung unterschiedlicher Duty Cycle-Einstellungen auf das Auftreten von Nebenwirkungen der Ultraschallbehandlung an ischämischem Hirngewebe untersucht. Des Weiteren sollte die Wirkung des Ultraschalls auf das Gehör der Ratte evaluiert werden, um Rückschlüsse auf mögliche, schädigende Einflüsse niederfrequenten Ultraschalls auf das Innenohr ziehen zu können. Dieser Teil der Studie wurde in Kooperation mit der HNO-Klinik der Universität Mainz durchgeführt.

Die Isoflurannarkose wurde wie bei der vorangegangenen Untersuchung und wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Versuche wurden gemeinsam mit cand.med Julia Masomi durchgeführt. Diese Studie wird ebenso als medizinische Doktorarbeit eingereicht.

3.2.3 Auswertung der Daten

Vor dem neurologischen Experiment und 24 h nach der Okklusion wurde eine neurologische Testung durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Gehirne geschah in zwei Schritten. Erstens wurden die Hirne entnommen und in 7-9 Scheiben geschnitten. Hierbei wurden stets die Scheiben 2 und 4 aus der Matrix direkt in einer 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Zur weiteren Verarbeitung wurden diese Proben in die Abteilung für Neuropathologie/Mainz gebracht. Die restlichen Schnitte wurden TTC gefärbt.

Zunächst soll in diesem Kapitel die neurologische Duty Cycle Studie behandelt werden und gegen Ende des Kapitels die HNO-Daten besprochen werden.

3.2.3.1 Neurologische Auswertung

Die Auswertung der neurologischen Beurteilung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen einer ultraschallbehandelten Gruppe (0,1 W/cm² mit DC 20%) verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 3-9), mit einem schlechteren funktionellen Ergebnis der Tiere in der mit kurzem Duty Cycle behandelten Gruppe. Die anderen ultraschallbehandelten Gruppen (längerer Duty Cycle, kurzer Duty Cycle mit reduzierter Intensität) zeigten im Vergleich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Gruppe 4 wird hier nicht aufgeführt, da alle Tiere vor Ablauf der Versuchsdauer verstarben.

Die Einzelanalyse des Neurologischen Scores ergab bei der Erhebung der Hörfähigkeit „Hearing“ nur in den Schallgruppen eine Beeinträchtigung (Abb. 3-10). In den Gruppen 1 und 3 wurde eine Schwerhörigkeit bei 25% der Tiere diagnostiziert und in der Gruppe 2 sogar von 62,5%.

3.2.3.2 Histologische Auswertung

Nach Analyse der Läsionsvolumina ergab sich eine signifikante Zunahme des ischämischen Läsionsvolumens in den mit kurzem Duty Cycle (20%) behandelten Gruppen verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 3-11). Dieser negative Effekt fand sich bei längerer Duty Cycle-Einstellung (80%) nicht.

Alle Tiere aus Gruppe 4 (0,1 W/cm², 100% Duty Cycle) verstarben vor Ablauf des Experiments. Todesursache war in 6 von 8 Fällen eine SAB. Exemplarisch sind einige Bilder einer solchen SAB dargestellt (Abb. 3-15).

Des Weiteren ließen sich auch in den anderen Versuchsgruppen SABs nachweisen. Die Blutungsrate erreichte in der Gruppe mit kurzem Duty Cycle und einer Intensität von $0,1 \text{ W/cm}^2$ statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.3.3 Mortalität

Die Mortalität der Tiere während des Experiments war in der cw-Gruppe signifikant erhöht, da hier kein Tier die Dauer des Experiments von 24 h überlebte. In den anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ermittelt werden (Abb. 3-13).

3.2.3.4 Auswertung der Hörschwellenbestimmung

24 Stunden nach einer Ultraschallbehandlung konnte bei 4 von 12 Tieren eine beidseitige Schwerhörigkeit ermittelt werden. Die Hörminderung betrug zwischen 20 und 40 dB pro Ohr und war unabhängig von der Ultraschallintensität oder dem Duty Cycle. Die Hörminderung wurde über den Vergleich der Baseline mit der Messung nach erfolgter Beschallung/Schein-Beschallung bestimmt (Abb. 3-14).

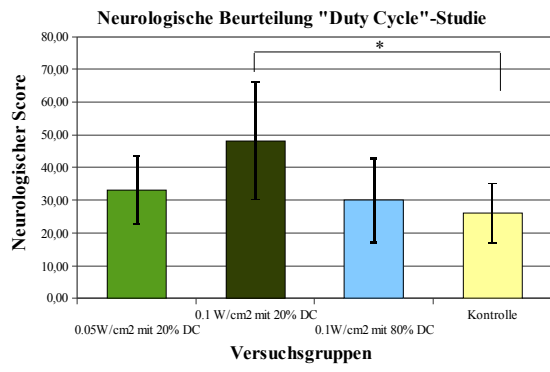


Abbildung 3-9

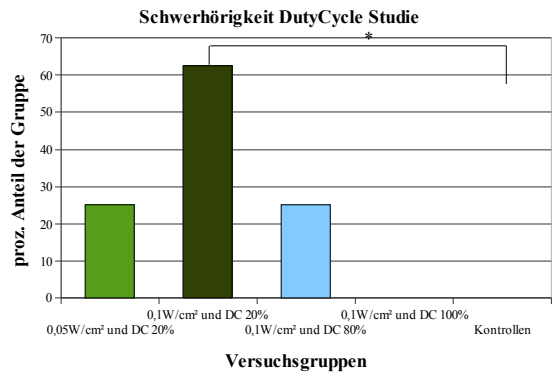


Abbildung 3-10

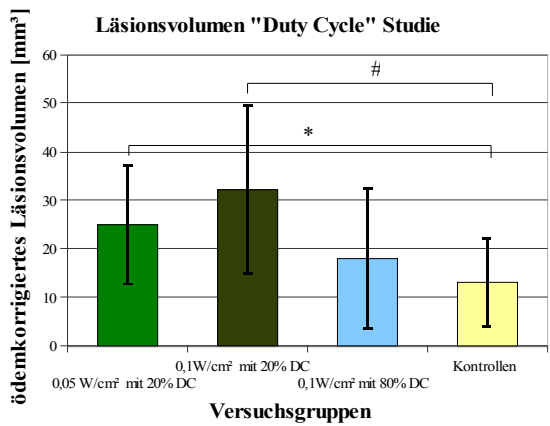


Abbildung 3-11

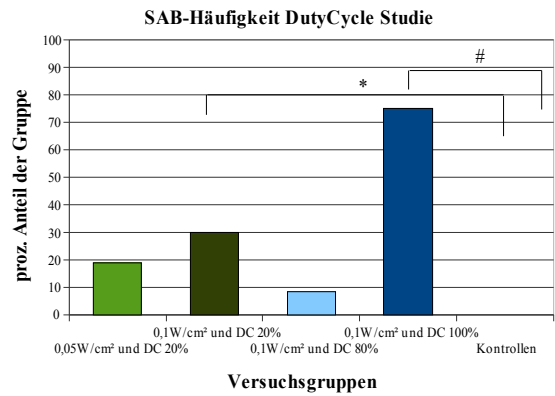


Abbildung 3-12

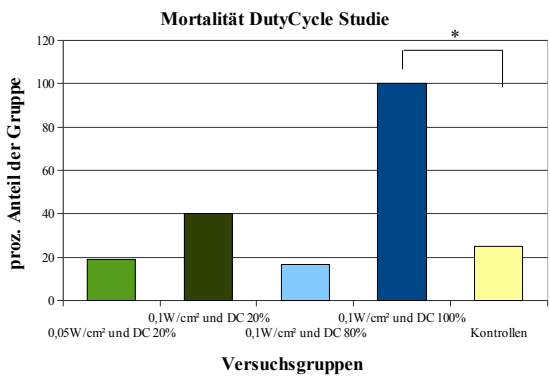


Abbildung 3-13

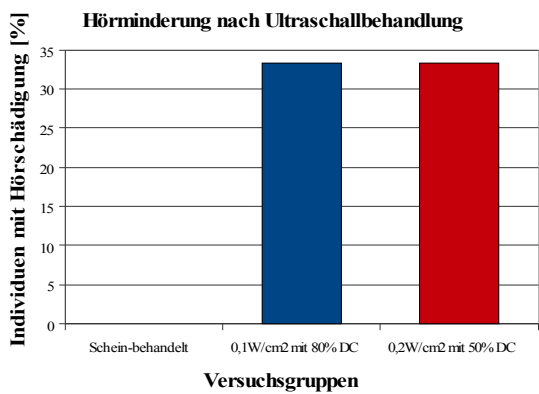


Abbildung 3-14

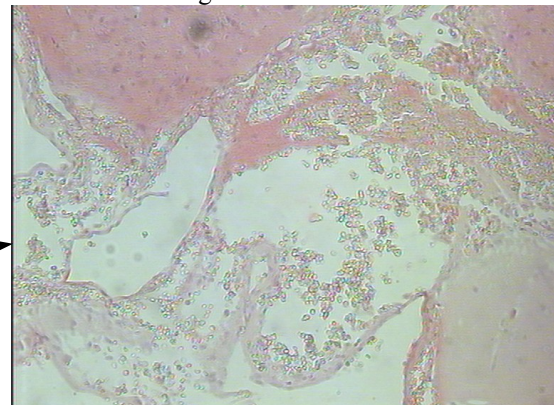
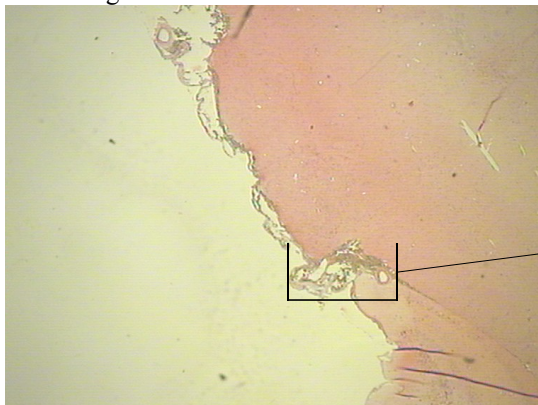


Abbildung 3-15

Abbildung 3-9: Neurologische Beurteilung der Versuchstiere

Dargestellt sind die Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen, welche die Dauer des Experiments von 24 h überlebten. Die Gruppe behandelt mit einer Leistung von $0,1 \text{ W/cm}^2$ und einem kurzen Duty Cycle (DC) von 20% zeigte einen signifikanten Unterschied verglichen mit der Kontrollgruppe (* $p = 0,01$).

Abbildung 3-10: Einzelauswertung des Hörvermögens aus der neurologischen Beurteilung

Die Einzelauswertung des NDS ergab dargestelltes Muster bei der Beurteilung des Hörvermögens. Demnach sind in den Gruppen $0,05 \text{ W/cm}^2$ mit DC 20% und $0,1 \text{ W/cm}^2$ mit DC 80% etwa 25% und 62,5% ($0,1 \text{ W/cm}^2$) der Tiere in den Versuchsgruppen nachgewiesener Maßen schwerhörig (* $p = 0,01$).

Abbildung 3-11: Histologische Auswertung nach TTC-Färbung

Die ultraschallbehandelten Gruppen (Duty Cycle 20%) zeigten einen signifikant größeres Läsionsvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,05 \text{ W/cm}^2$ * $p < 0,05$; $0,1 \text{ W/cm}^2$ # $p < 0,05$).

Abbildung 3-12: SAB-Neigung nach Ultraschallbehandlung

Die ultraschallbehandelten Gruppen ($0,1 \text{ W/cm}^2$ mit DC 20% und cw/100%) zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (DC 20% * $p = 0,01$; DC 100% # $p < 0,01$).

Abbildung 3-13: Mortalität der Tiere während des Experiments

Die Tiere der cw-Gruppe hatten eine signifikant höhere Mortalitätsrate (vor Ablauf der Untersuchungsphase von 24 h) verglichen mit der Kontrollgruppe. (* $p < 0,00001$).

Abbildung 3-14: Hörschwellenbestimmung beschallter und unbehandelter Tiere nach 24 h

In den Schallgruppen zeigt jeweils ein Drittel eine objektivierbare Schwerhörigkeit. In der zum Schein behandelten Gruppe wurde bei keinem Tier eine Schwerhörigkeit nachgewiesen.

Abbildung 3-15: HE-Färbung eines Gehirns mit SAB

Exemplarische Darstellung einer SAB nach Behandlung mit $0,1 \text{ W/cm}^2$ und einem Duty Cycle von 100% (cw). Die SAB (siehe Pfeil) wurde in diesem Schnitt an der basalen Seite des Gehirns lokalisiert.

3.3 Vergleich der Genexpression nach verschiedenen Ultraschallbehandlungen (60, 488 kHz und 3 MHz)

3.3.1 Versuchsaufbau

Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten (Tag + Nacht-Rhythmus) und stets von einer Person während des Versuchs betreut. Die Ratten (Stamm Wistar) wurden von Charles River (Sulzbach) gezüchtet und geliefert. Es fand keine Ischämieinduktion in den Schallgruppen statt. Es handelte sich um native Tiere, die lediglich zur Beschallung/Sham-Beschallung für etwa 75 min. in Narkose (Isofluran) lagen. Als positive Kontrollen für die selbst entwickelten Assays wurden Tiere mit dem Fadenmodell operiert und nach verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert (Tabelle 3-4).

Die Gruppeneinteilung der Tiere war folgende:

| | | |
|-----------|--|-------|
| Gruppe 1 | Ultraschallgruppe 60 kHz mit Tötungszeitpunkt 4 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 2 | Ultraschallgruppe 488 kHz mit Tötungszeitpunkt 4 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 3 | Ultraschallgruppe 3 MHz mit Tötungszeitpunkt 4 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 4 | Sham-Ultraschallgruppe mit Tötungszeitpunkt 4 h | n = 6 |
| Gruppe 5 | Ultraschallgruppe 60 kHz mit Tötungszeitpunkt 24 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 6 | Ultraschallgruppe 488 kHz mit Tötungszeitpunkt 24 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 7 | Ultraschallgruppe 3 MHz mit Tötungszeitpunkt 24 h nach Beschallung | n = 6 |
| Gruppe 8 | Sham-Ultraschallgruppe mit Tötungszeitpunkt 24 h | n = 6 |
| Gruppe 9 | native Tiere, ohne jegliche Behandlung | n = 6 |
| Gruppe 10 | Tiere mit Ischämie → Tötung 1,5 h nach Ischämieinduktion | n = 5 |
| Gruppe 11 | Tiere mit Ischämie → Tötung 4 h nach Ischämieinduktion | n = 5 |
| Gruppe 12 | Tiere mit Ischämie → Tötung 24 h nach Ischämieinduktion | n = 5 |

Tabelle 3-4: Gruppeneinteilung Genexpressionsstudie

3.3.2 Ziel der Studie

Diese Studie wurde entworfen, um die bislang kaum analysierte Wirkung verschiedener Ultraschallfrequenzen auf die Genexpression zu untersuchen. Das Protokoll war bei allen drei Frequenzen das gleiche. Lediglich die Applikationsart des Ultraschalls unterschied sich. Ein Teil der Proben wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Dipl. biol. Andrej Fabrizio extrahiert und gemessen.

Als optimale Referenzgene wurden dabei *albumin*, *arp* und *gapdh* bestimmt und demnach zur Normalisierung der zu messenden Kandidatengene herangezogen. Hierzu wurden die ermittelten Expressionswerte der Kandidatengene durch den von geNorm errechneten Normalisierungsfaktor für die Referenzgene geteilt. Die Korrekturfaktoren sind im digitalen Anhang dargestellt.

3.3.2.1 Messung der Referenzgene (60 kHz)

Referenzgene sind Gene, deren Expression nicht durch die Behandlung des Gewebes beeinträchtigt wird. Die Expression bleibt also trotz einer Behandlung konstant. Da über die Auswirkungen von Ultraschall auf die Genexpression im Gehirn keine Daten vorhanden waren, wurde auf die am häufigsten zitierten Referenzgene in der Literatur zurückgegriffen (Bonefeld *et al.*, 2008). Als Kandidaten wurden *β -actin*, *Arp* (engl. Acidic ribosomal phosphoprotein), *Albumin*, *CyclophilinA* und *Gapdh* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet und zunächst die absolute Expression im zerebralen Kortex bestimmt (Abb. 3-16 bis 3-20).

Über die jeweilige Gruppe wurde der Mittelwert gebildet und ebenso die Standardabweichung errechnet. Die Expression der nativen Tiere wurde 100% gesetzt und die Mittelwerte der anderen Gruppe darauf normalisiert.

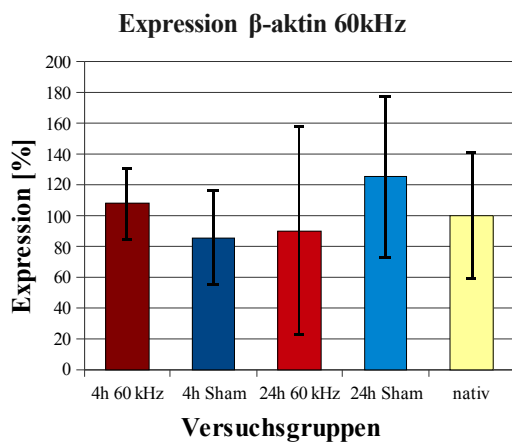


Abbildung 3-16

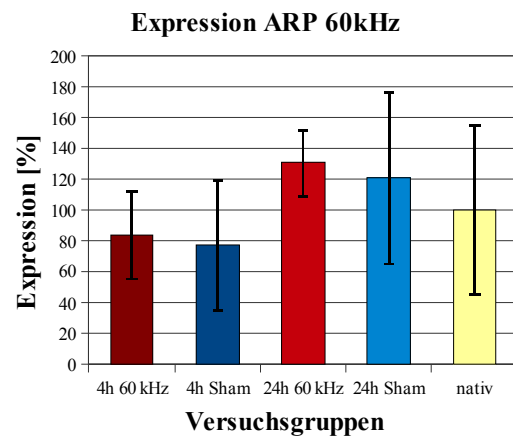


Abbildung 3-17

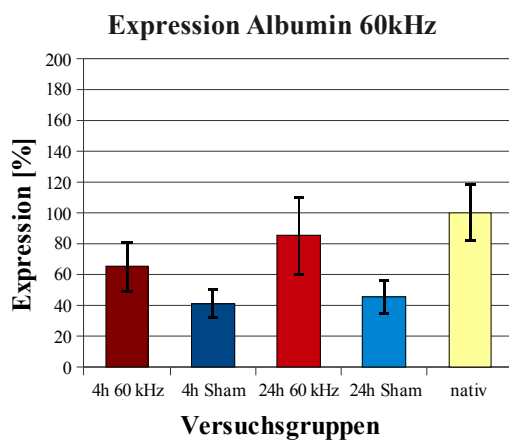


Abbildung 3-18

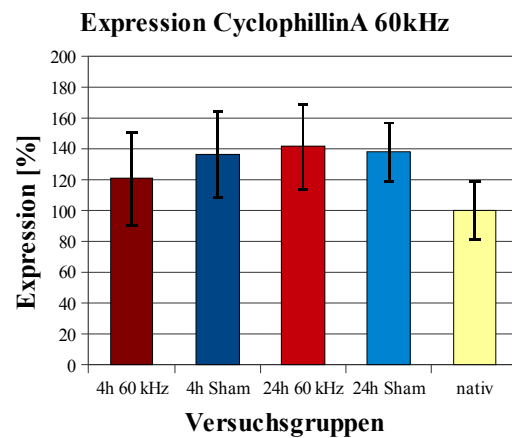


Abbildung 3-19

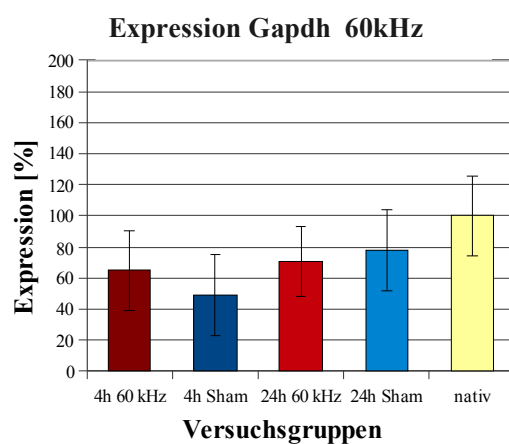


Abbildung 3-20

Abbildung 3-16: Expression des Referenzgens *β -aktin*

Graphisch dargestellt sind die Expressionswerte der verschiedenen Gruppen in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen.

Abbildung 3-17: Expression des Referenzgens *ARP*

Graphisch dargestellt sind die Expressionswerte der verschiedenen Gruppen in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen.

Abbildung 3-18: Expression des Referenzgens *Albumin*

Graphisch dargestellt sind die Expressionswerte der verschiedenen Gruppen in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben.

Abbildung 3-19: Expression des Referenzgens *Cyclophilin A*

Graphisch dargestellt sind die Expressionswerte der verschiedenen Gruppen in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen.

Abbildung 3-20: Expression des Referenzgens *Gapdh*

Graphisch dargestellt sind die Expressionswerte der verschiedenen Gruppen in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen.

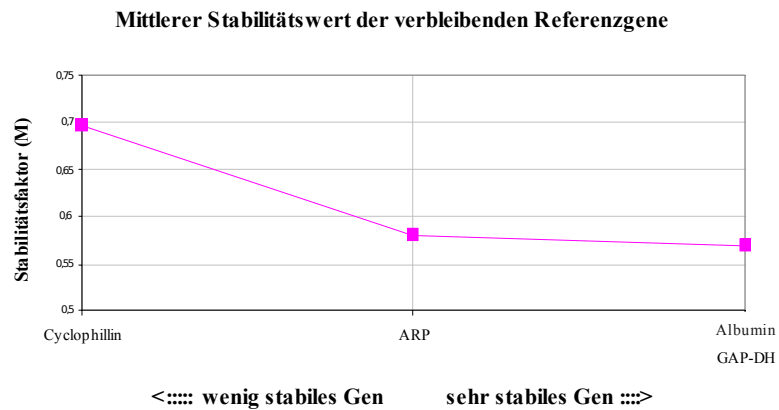


Abbildung 3-21: Mittlere Stabilität der gemessenen Referenzgene

Dem gezeigten Diagramm ist zu entnehmen, dass *Albumin*, *Gapdh* und *Arp* die stabilste Expression der getesteten Proben aufweisen und sich somit am besten als Referenzgene eignen.

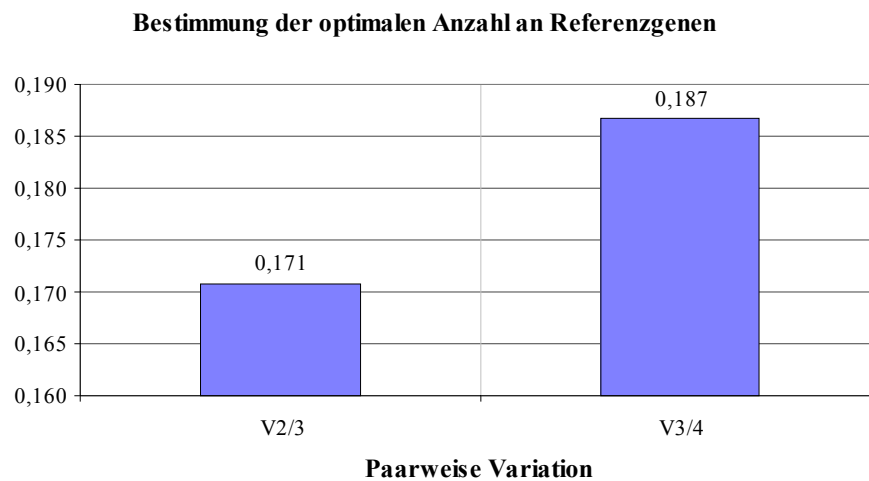


Abbildung 3-22: Bestimmung der Anzahl von Referenzgenen

Die optimale Anzahl der Referenzgene kann von Experiment zu Experiment variieren. Für diese Messungen wurde ermittelt, dass für die Auswertung 3 von 4 Referenzgenen herangezogen werden sollten.

3.3.2.2 *Messung der Referenzgene (488 kHz und 3 MHz) und Ischämieproben*

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden auch für die Messungen/Proben der 488 kHz- und 3 MHz-Sonde sowie Ischämieproben Normalisierungsfaktoren errechnet (siehe digitaler Anhang). Für die Normalisierung der Expressionsmessungen der 488 kHz/3 MHz-Proben wurden die Referenzgene *Arp*, *Albumin*, *β -actin* und *Cyclophilin A* ausgewählt und die Normalisierungsfaktoren errechnet. Referenzgene der Ischämieproben waren *Arp* und *Gapdh*.

3.3.2.3 *Genexpression nach fokaler Ischämie und Ultraschallbehandlung*

Die Expressionsmessung der selektierten Kandidatengene sollte einen ersten Eindruck über den Einfluss von Ultraschall unterschiedlicher Frequenzen (60 und 488 kHz und 3 MHz) geben. Hierzu wurden die Gene nach ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt. Die Normalisierung geschah mit Hilfe der zuvor ermittelten Faktoren. Die Ergebnisse der Messungen sind in folgender Reihenfolge beschrieben: Ischämie (Isch), 60 kHz, 488 kHz und 3 MHz. Die Regulationsfaktoren befinden sich hinter der Angabe der Zeitpunkte in Klammern. Ein + steht hierbei für eine Hochregulation und ein – für eine Herunterregulation.

Apoptose

Zunächst sollen die proapoptischen Gene dargestellt werden. Diese gehören zu der Familie der *Caspasen*, welche eine Gruppe von 12 Proteasen umfasst.

Caspase3/9

Isch → Nach fokaler, zerebraler Ischämie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Messung von *caspase 3* der Ischämiegruppen im Vergleich zur nativen Gruppe (siehe digitaler Anhang). *Caspase 9* hingegen zeigte eine signifikante Änderung der Expression 1,5 h (-1,95) und 4 h (-2,07) nach induzierter Ischämie (Abb. 3-23).

60 kHz → Die mit 60 kHz beschallten Gruppen zeigen keine signifikante Expressionsänderung der beiden *Caspasen* (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Nach einer Ultraschallbehandlung mit 488 kHz bzw. 3 MHz zeigten sich signifikante Expressionsänderungen in den ultraschallbehandelten Gruppen verglichen mit den Sham-Gruppen. Die Expression des Gens *caspase 3* war in den mit 488 kHz ultraschallbehandelten Gruppen signifikant erniedrigt (4 h → -2,9; 24 h → -1,75) (Abb. 3-24). Auch das Gen *caspase 9* zeigte an beiden Zeitpunkten nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung eine signifikante Erniedrigung in der Expression (4 h → -1,92; 24 h → -1,47). Zusätzlich konnte

eine signifikante Expressionserhöhung in der mit 3 MHz ultraschallbehandelten Gruppe nach 24 h detektiert werden (+1,1) (Abb. 3-25).

Als anti-apoptotische Gene wurden drei Mitglieder der Akt-Familie (auch als Proteinkinase B, PKB bezeichnet) sowie das Gen *bcl-2* (engl. B-cell- lymphoma) auf deren Expression untersucht.

Proteinkinase B (Akt1-3)

Isch → An allen drei Zeitpunkten nach Ischämieinduktion zeigte sich bei den Genen *Akt1+2* keine signifikante Änderung der Expression verglichen mit den nativen Proben. Es ist zu erwähnen, dass für das Gen *Akt3* keine nativen Proben gemessen wurden. In diesem Falle wurden die Ischämie-Gruppen untereinander verglichen. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (siehe digitaler Anhang).

60 kHz → Die Ergebnisse der Genexpressionsmessung nach 60 kHz-Ultraschallbehandlung zeigten keine signifikante Veränderung der *akt*-Expression (bei den Genen 1-3) verglichen zu den Sham-Gruppen (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → In den anderen Ultraschallgruppen hingegen, zeigten sich in allen drei gemessenen akt-Genen signifikante Änderungen. Das Gen *Akt1* zeigte in der 4 h Gruppe der 488 kHz-Behandlung eine signifikant erniedrigte Expression (-2,2) im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb. 3-26). Ebenfalls nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung konnte für das Gen *akt2* eine signifikant niedrigere Expression (4 h → -2,88; 24 h → -2,28) gemessen werden (Abb. 3-27). *Akt3* zeigte ein anderes Expressionsmuster der Ultraschallgruppen im Vergleich zu den anderen akt-Genen. Hier konnte 24 h nach einer 3 MHz-Ultraschallbehandlung eine signifikant höhere Expression (+2,61) nachgewiesen werden (Abb. 3-28).

B-cell- lymphoma-2 (bcl-2)

Isch → 90 min. nach induzierter fokaler Ischämie zeigte sich eine signifikante Erhöhung der *bcl-2*-Expression (+1,77) verglichen zur Nativ-Gruppe (Abb. 3-29).

60 kHz → Nach einer Ultraschallbehandlung mit 60 kHz Ultraschall zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der *bcl-2*-Expression (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Nach einer Behandlung mit 488 kHz und 3 MHz Ultraschall wurde am gleichen Zeitpunkt (24 h nach Behandlung) eine signifikant erhöhte Expression (488 kHz → +1,56; 3 MHz → +1,87) von *bcl-2* im zerebralen Kortex gemessen (Abb. 3-30).

Apoptosis- inducing Factor (AiF)

Isch → 4 h nach induzierter fokaler Ischämie wurde eine signifikante Erniedrigung der *AiF*-Expression im Vergleich zur Nativ-Gruppe detektiert.

60 kHz → Die Messung der Expression von *AiF* nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung zeigte keine signifikanten Unterschiede der Genexpressionsmessung (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → 4 h nach einer 3 MHz Ultraschallbehandlung konnte eine signifikante Erhöhung der *AiF*-Expression (+1,2) nachgewiesen werden. Die anderen Gruppen waren in ihrer Expression nicht verändert (Abb. 3-32).

Tumor necrosis Factor (TNF- α)

Isch/60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die Expression von *TNF- α* war nach allen Behandlungen (Ischämie und Ultraschallbehandlung) im zerebralen Kortex nicht verändert (siehe digitaler Anhang).

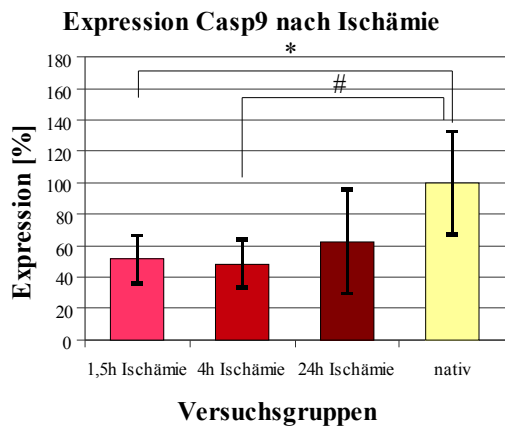


Abbildung 3-23

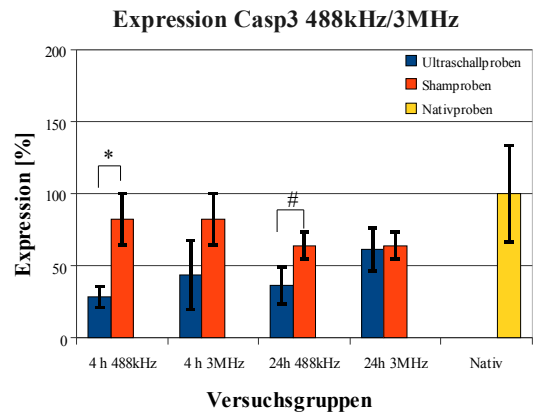


Abbildung 3-24

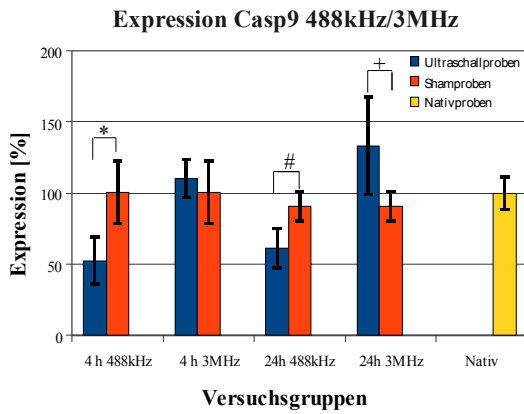


Abbildung 3-25

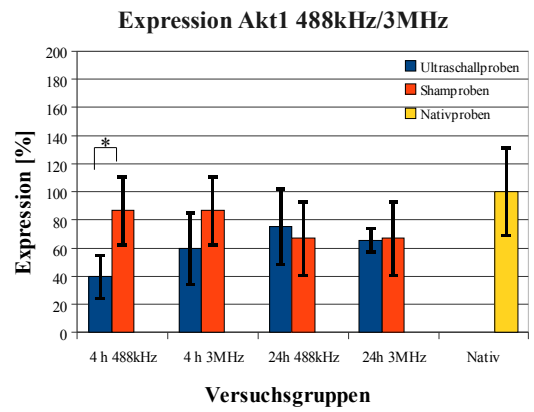


Abbildung 3-26

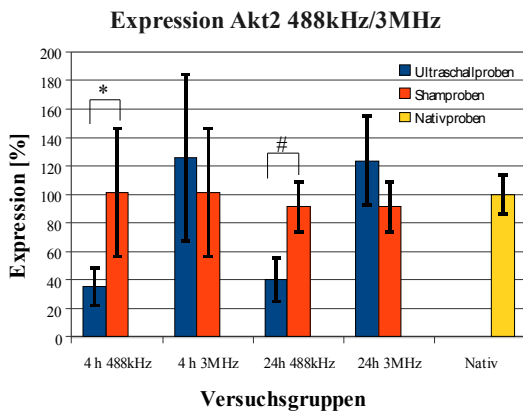


Abbildung 3-27

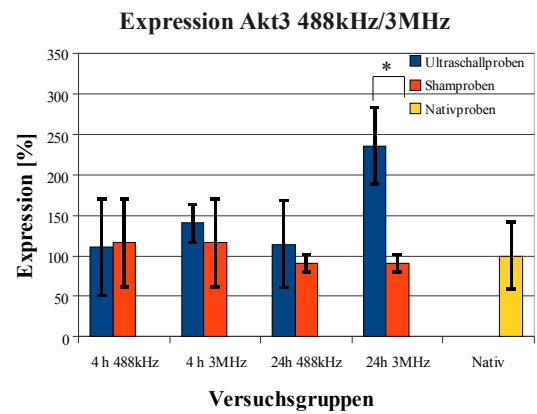


Abbildung 3-28

Abbildung 3-23: Expression von *Caspase 9* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 1,5 und 4 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (*p = 0,01; #p = 0,01).

Abbildung 3-24: Expression von *Caspase 3* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 und 24 h Gruppe der 488 kHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p < 0,001; #p < 0,05).

Abbildung 3-25: Expression von *Caspase 9* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 und 24 h Gruppe der 488 kHz Behandlung und 24 h Gruppe der 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p = 0,002; #p = 0,002; + p = 0,02).

Abbildung 3-26: Expression von *Akt1* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppe der 488 kHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p < 0,05).

Abbildung 3-27: Expression von *Akt2* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 und 24 h Gruppe der 488 kHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p = 0,01; # p < 0,001).

Abbildung 3-28: Expression von *Akt3* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe der 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p < 0,05).

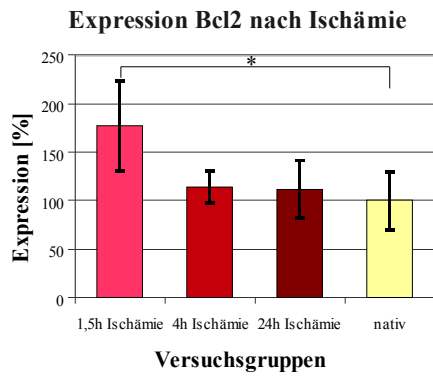


Abbildung 3-29

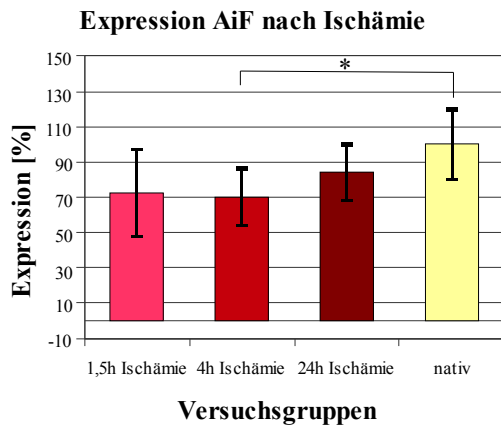


Abbildung 3-31

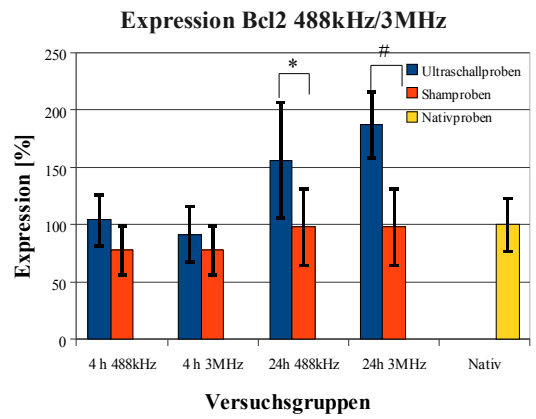


Abbildung 3-30

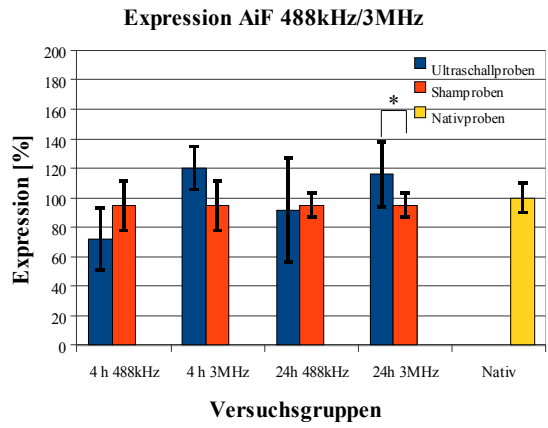


Abbildung 3-32

Abbildung 3-29: Expression von *Bcl2* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-30: Expression von *Bcl2* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 und 24 h Gruppe der 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Abbildung 3-31: Expression von *AiF* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 4 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-32: Expression von *AiF* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppe der 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$).

Angiogenese

Zur Untersuchung der Angiogenese nach einer Ultraschallbehandlung wurden verschiedene Angiogenesefaktoren und Transkriptionfaktoren gemessen.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Isch/60 kHz → Die Expressionsmessung der Ischämie- und 60 kHz- Proben hat ergeben, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den Gruppen gibt (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Es konnte lediglich 4 h nach erfolgter 488 kHz-Ultraschallbehandlung eine signifikante Erniedrigung (-1,8) der *VEGF*-Expression detektiert werden (Abb. 3-33).

Early Growth Response (Egr1)

Isch → Die Messung von *Egr1* nach induzierter Ischämie ergab keine signifikante Veränderung der Expression. Lediglich eine Aufwärtstendenz konnte nach 1,5 h nachgewiesen werden (siehe digitaler Anhang).

60 kHz → Die Expressionsniveaus der 60 kHz Proben verhielten sich ähnlich. Hier konnte ebenfalls keine signifikante Expressionsänderung der behandelten verglichen mit den unbehandelten Tieren gemessen werden. Es fällt jedoch auf, dass alle Proben verglichen mit den nativen Proben in ihrer Expression signifikant erniedrigt waren (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Anders verhält es sich bei der Messung der 488 kHz-Proben. Hier konnte sowohl 4 h (-4,15) als auch 24 h (-2,75) nach der Ultraschallbehandlung eine signifikant erniedrigte Expression nachgewiesen werden (Abb. 3-34). Die mit 3 MHz Ultraschall behandelten Proben zeigten keine Expressionsänderung.

Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr)

Isch → 24 h nach fokaler Ischämie konnte eine signifikant höhere Genexpression (+2,32) nachgewiesen werden. Zuvor blieb die Expression unverändert (Abb. 3-35).

60 kHz → Nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung konnte keine signifikante Expressionsänderung detektiert werden. Lediglich eine Aufwärtstendenz 24 h nach der Behandlung konnte ermittelt werden (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Die Ultraschallbehandlung mit 488 kHz und 3 MHz hatte eine signifikante Expressionsänderung zur Folge, die 4 h nach der Behandlung nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-36). Es handelte sich um eine Verminderung der Genexpression (488 kHz → -2,45; 3 MHz → -2,31).

Ephrin-5 (EFNA)

Isch → 1,5 h (-2,27) und 4 h (-1,60) nach fokaler Ischämie konnte eine signifikante Absenkung des Expressionsniveaus verglichen mit den nativen Proben beobachtet werden (Abb. 3-37).

60 kHz → Die Behandlung der Tiere mit 60 kHz Ultraschall führte nicht zu einer Expressionsänderung. Die Expressionslevel blieben alle auf dem Niveau der nativen Gruppe (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → 4 h nach einer 488 kHz (-3,16) und 3 MHz (-2,66) Ultraschallbehandlung zeigte sich eine signifikante Erniedrigung des Expressionslevels verglichen zu den Sham-Tieren (Abb. 3-38).

Angiopoietin-01 (Ang-01)

Isch → Nach fokaler Ischämie konnte keine Veränderung des *AngiopoietinsI* nachgewiesen werden. An allen drei Zeitpunkten entsprach die Expression in etwa der der nativen Gruppe (siehe digitaler Anhang).

60 kHz → Auch nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung konnte keine Expressionsänderung detektiert werden (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → 4 h nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung konnte eine signifikante Erniedrigung des Expressionslevels (-2,16) beobachtet werden (Abb. 3-39).

Angiopoietin-02 (Ang-02)

Isch → Anders verhielt es sich bei der Messung des *Ang-2*, welches 24 h (+7,15) nach einem ischämischen Ereignis als deutlich hoch reguliert wurde (Abb. 3-40).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die ultraschallbehandelten Proben hingegen zeigten keine signifikante Expressionsänderung an (siehe digitaler Anhang).

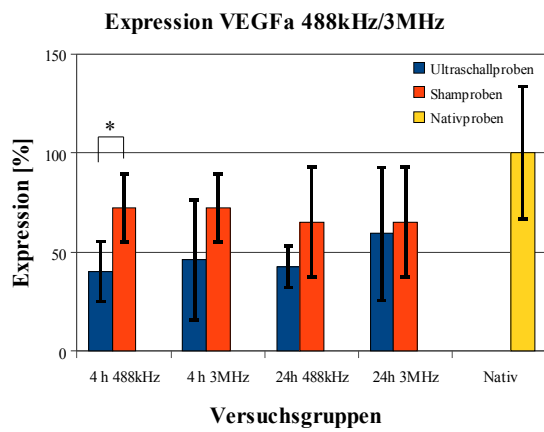


Abbildung 3-33

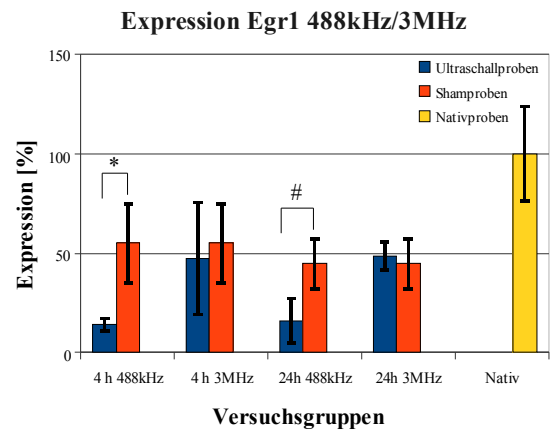


Abbildung 3-34

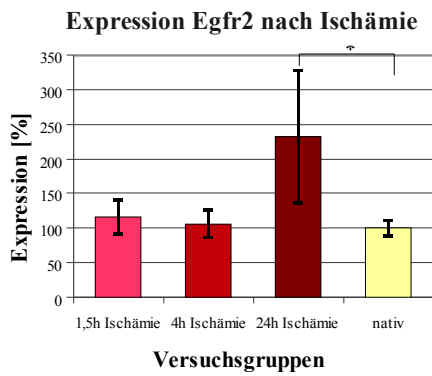


Abbildung 3-35

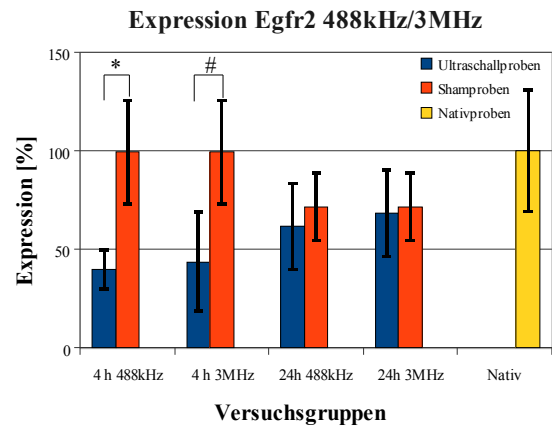


Abbildung 3-36

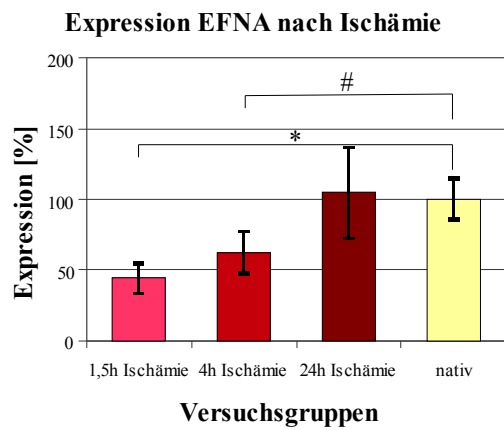


Abbildung 3-37

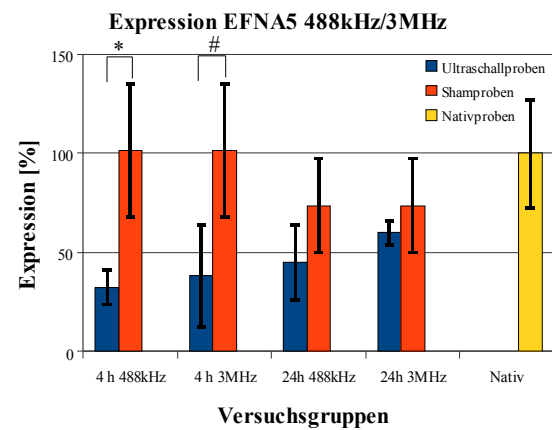


Abbildung 3-38

Abbildung 3-33: Expression von *VEGF* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppe der 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-34: Expression von *Egr1* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h und 24 h Gruppe der 488 kHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Abbildung 3-35: Expression von *Egfr2* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-36: Expression von *Egfr2* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppen nach einer 488 kHz und 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p = 0,002$; # $p = 0,05$).

Abbildung 3-37: Expression von *EFNA* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h und 4 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,0001$; # $p < 0,05$).

Abbildung 3-38: Expression von *EFNA* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppen nach einer 488 kHz und 3 MHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

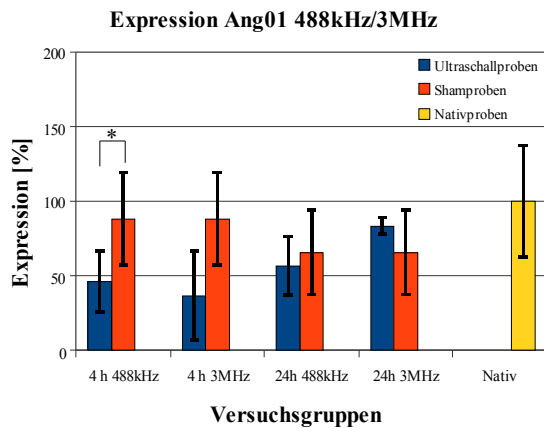


Abbildung 3-39

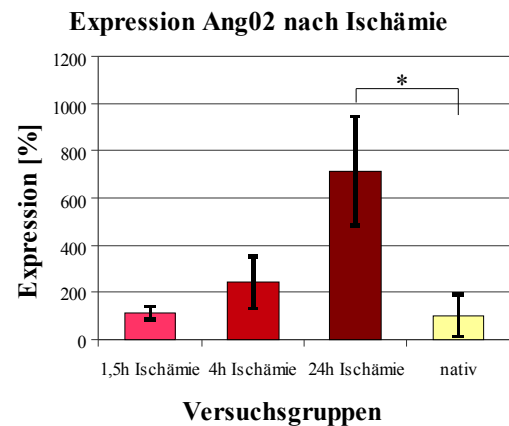


Abbildung 3-40

Abbildung 3-39: Expression von *Ang01* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 4 h Gruppen nach einer 488 kHz Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-40: Expression von *Ang02* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Stressfaktoren

Stressfaktoren sind für den Schutz von Gewebe nach verschiedenen pathologischen Prozessen sehr wichtig. Aus der Literatur wurden einige wichtige Stressfaktoren selektiert und auf Basis der vorhandenen Proben untersucht.

Heat Shock Proteins (Hsp27/Hsp70)

Isch → Bei beiden gemessenen Hitze Schock-Proteinen konnte ein signifikanter Anstieg 24 h nach Induktion einer zerebralen Ischämie verzeichnet werden (*Hsp27* → +21,88; *Hsp70* → +3,92). Allerdings ist bei *hsp 70* nur der Vergleich der Ischämiegruppen untereinander möglich, da keine Messwerte der nativen Proben vorlagen. Die signifikanten Änderungen bei *Hsp70* beziehen sich auf die Gruppe 1,5 h (Abb. 3-41+3-42).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → In allen Ultraschallgruppen (60 kHz, 488 kHz und 3 MHz) konnte keine signifikante Änderung in der Expression detektiert werden (siehe digitaler Anhang).

Immediate Early Genes (IEGs → C-fos; Jun)

Isch → Die Messung der Expression nach induzierter fokaler Ischämie ergab für das Gen *C-fos* keine signifikante Expressionsänderung. Lediglich eine positive Tendenz war 1,5 h nach Ischämieinduktion zu verzeichnen (siehe digitaler Anhang). Anders verhielt es sich beim *IEG Jun*, welches sowohl nach 4 h (+1,66) als auch nach 24 h (+2,21) signifikant hoch reguliert wurde (Abb. 3-43).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung konnte keine Expressionsänderung beider *IEGs* detektiert werden und nach einer 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung kam es ebenfalls zu keiner Expressionsänderung von *jun* (siehe digitaler Anhang).

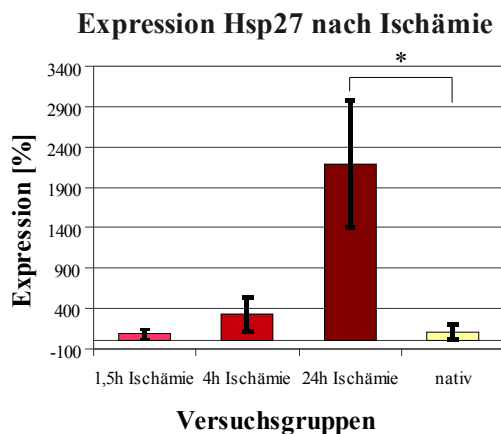


Abbildung 3-41

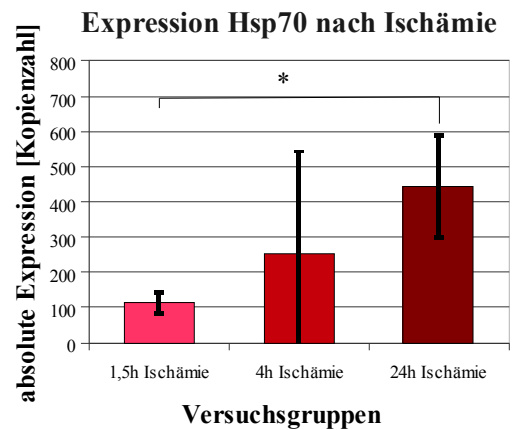


Abbildung 3-42

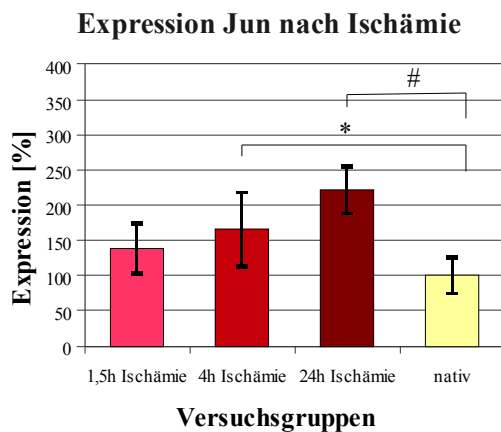


Abbildung 3-43

Abbildung 3-41: Expression von *Hsp27* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-42: Expression von *Hsp70* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) angegeben in absoluter Kopienzahl. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die 1,5 h Gruppe gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-43: Expression von *Jun* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 4 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,001$).

NO-Synthasen

nNOS

Isch → Die Expression der *nNOS* erhöhte sich 1,5 h (+1,47) und 24 h (+2,23) nach einem ischämischen Ereignis signifikant im Vergleich zur nativen Gruppe. An dem Zeitpunkt 4 h nach Induktion der Ischämie konnte keine Expressionsänderung detektiert werden (siehe Abb. 3-44).

60 kHz → Im Anschluss an eine 60 kHz Ultraschallbehandlung kam es 24 h (+2,58) später zu einer signifikanten Expressionszunahme im Vergleich zur scheinbehandelten Gruppe (Abb. 3-45).

488 kHz/3 MHz → Auch 24 h nach einer 488 kHz (+2,32) und 3 Mhz (+2,65) Behandlung konnte eine signifikante Erhöhung der Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 3-46).

iNOS

Isch → Nach erfolgter fokaler Ischämie konnte zunächst eine signifikante Erniedrigung des Expressionslevels nach 1,5 h (-2,34) beobachtet werden. 24 h nach dem ischämischen Ereignis hingegen war ein deutlicher Expressionsanstieg (+10,45) zu verzeichnen (Abb. 3-47).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Nach den verschiedenen Ultraschallbehandlungen wurde keine signifikante Expressionsänderung der *iNOS* detektiert (siehe digitaler Anhang).

eNOS

Isch → Im Anschluss an eine transiente Ischämie konnte zunächst nach 1,5 h (-2,66) ein signifikanter Abfall der Expression gemessen werden. Die Messung nach 24 h ergab jedoch wie bei der *iNOS* einen signifikanten Anstieg (+3,87) der *eNOS*-Expression (Abb. 3-48). Auch diese Daten stimmen mit der Literatur überein.

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die Ultraschallbehandlung mit 60 kHz, 488 kHz oder 3 MHz hatte keine Expressionsänderung der *eNOS* zur Folge (siehe digitaler Anhang).

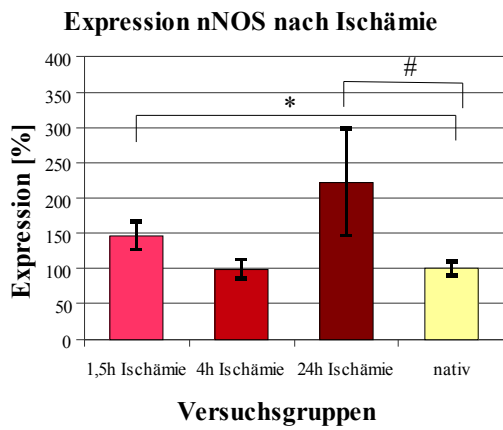


Abbildung 3-44

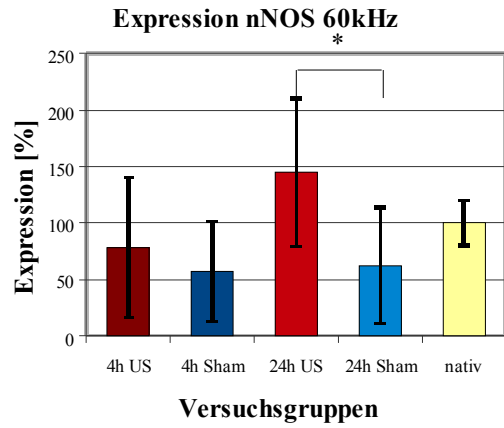


Abbildung 3-45

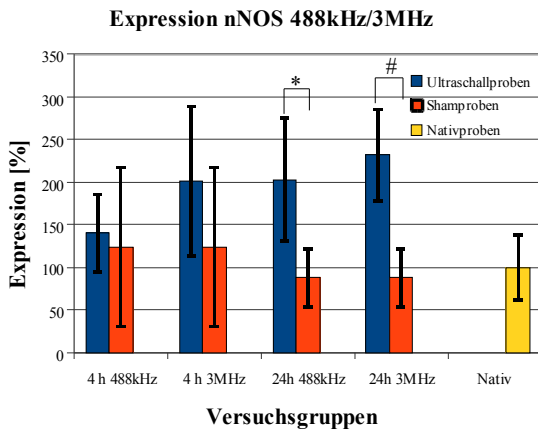


Abbildung 3-46

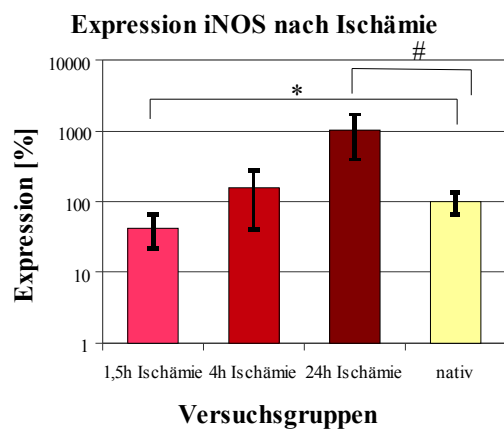


Abbildung 3-47

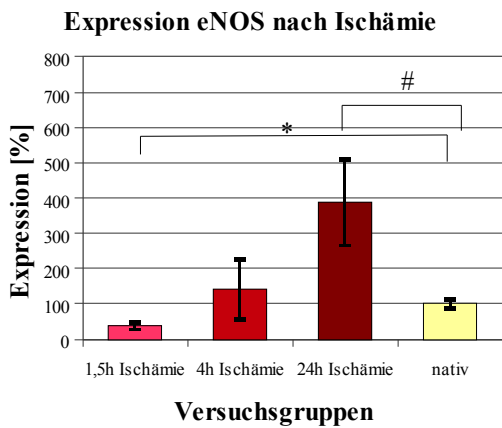


Abbildung 3-48

Abbildung 3-44: Expression der *nNOS* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Abbildung 3-45: Expression der *nNOS* nach 60 kHz Ultraschallbehandlung

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (4 h, 24 h nach Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die Sham-Proben gemessen (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-46: Expression der *nNOS* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 24 h Gruppen nach einer 488 kHz- und 3 MHz-Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$).

Abbildung 3-47: Expression der *iNOS* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Zur besseren Darstellung wurden die Expressionswerte logarithmisch aufgetragen. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 1,5 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Abbildung 3-48: Expression der *eNOS* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (* $p < 0,0001$; # $p < 0,05$).

Oxidativer Stress und Globine

Nuclear factor– erythroid 2–related factor 2 (Nrf2)

Isch → Nach transienter Ischämie zeigte sich eine stetige Steigerung der Genexpression mit fortschreitender Zeit. Da hier jedoch keine native Gruppe mitgemessen wurde, beziehen sich die Regulationsfaktoren auf die Gruppe 1,5 h (4 h→ +1,9; 24 h→ +2,54) (Abbildung 3-49).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die Expression von *Nrf2* zeigte nach den verschiedenen Ultraschallbehandlungen keine signifikante Änderung (siehe digitaler Anhang).

Superoxid-Dismutasen (SOD-1 + -2)

Isch → Nach zerebraler, fokaler Ischämie findet sich eine signifikante Expressionerniedrigung nach 1,5 h (-2,9) für die *SOD-1*-Expression. Nach 4 h bzw. 24 h hat sich die Expression wieder normalisiert (Abb. 3-50). Die *SOD-2* Expression ist 24 h nach induzierter Ischämie deutlich signifikant erhöht (+3,47) (Abb. 3-51).

60 kHz → Die Messung der mit 60 kHz-Ultraschall behandelten Proben ergab sowohl bei der *SOD-1* als auch der *SOD-2* keine signifikante Expressionsänderung (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Die Proben der 488 kHz und 3 MHz Behandlung wurden nicht auf die Expression dieses Faktors hin überprüft.

Hämoxygenase 1 (Hmox)

Isch → Bereits 4 h nach Induktion einer fokalen Ischämie konnte ein signifikanter Anstieg (+17,14) der *Hmox*-Expression detektiert werden. Nach 24 h ist schließlich die Expression stark signifikant erhöht (+67,35) (Abb. 3-52).

60 kHz → Die Messung der mit 60 kHz-Ultraschall behandelten Proben ergab keine signifikante Expressionsänderung der *Hmox* (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Die Proben der 488 kHz und 3 MHz Behandlung wurden nicht auf die Expression dieses Faktors hin überprüft.

Neuroglobin (Ngb)

Isch → 1,5 h nach einer fokalen, zerebralen Ischämie konnte eine signifikante Expressionserhöhung (+1,52) des *Ngbs* ermittelt werden. Nach 24 h wurde eine signifikante Expressionserniedrigung (-1,96) im Kortex ermittelt (Abb. 3-53).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Nach den verschiedenen Ultraschallbehandlungen konnte keine signifikante Expressionsänderung ermittelt werden. Ein Unterschied in der 4 h Gruppe behandelt mit 60 kHz Ultraschall ist knapp nicht signifikant erhöht (siehe digitaler Anhang).

Cytoglobin (Cygb)

Isch → Nach fokaler zerebraler Ischämie konnte keine signifikante Expressionsänderung des *Cygb* detektiert werden (siehe digitaler Anhang).

60 kHz → Ebenso wie nach einer Ischämie, zeigte sich nach der Behandlung mit 60 kHz Ultraschall keine Änderung der *Cygb*-Expression (siehe digitaler Anhang).

488 kHz/3 MHz → Eine Behandlung mit 488 kHz und 3 MHz Ultraschall hingegen hatte einen Einfluss auf die Expression von *Cygb*. 24 h nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung sowie 4 h und 24 h nach einer 3 MHz Behandlung konnte ein signifikanter Anstieg der *Cygb*-Expression ermittelt werden (Abb. 3-54).

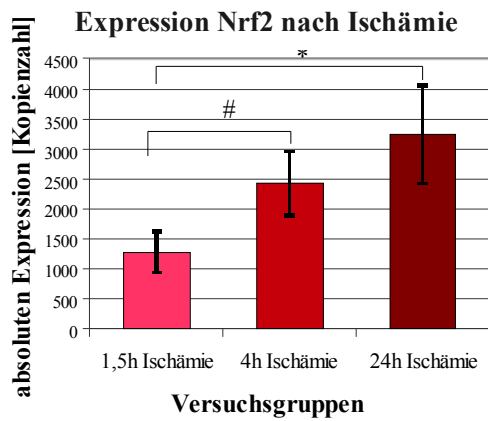


Abbildung 3-49

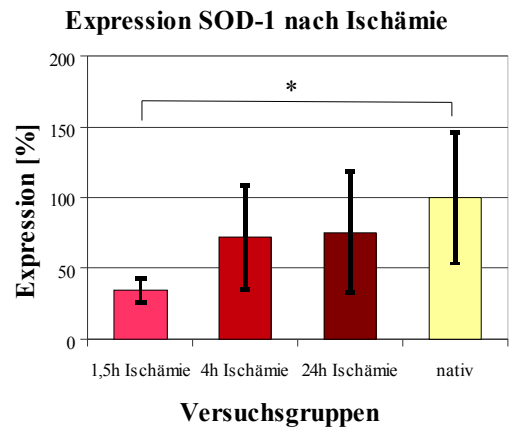


Abbildung 3-50

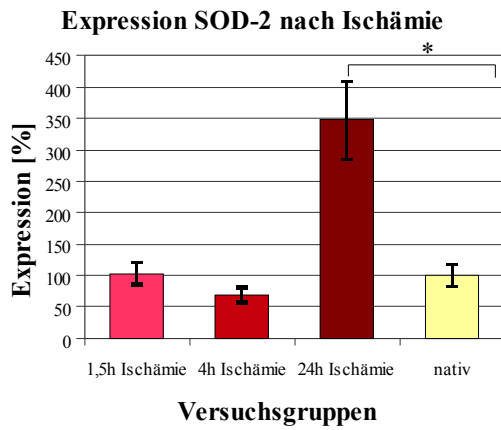


Abbildung 3-51

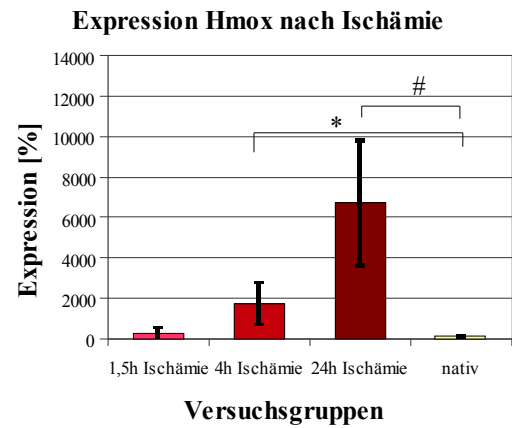


Abbildung 3-52

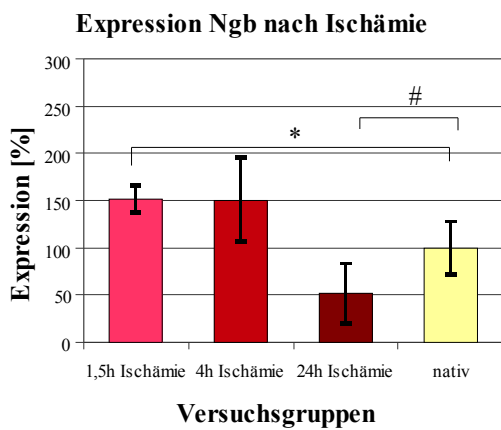


Abbildung 3-53

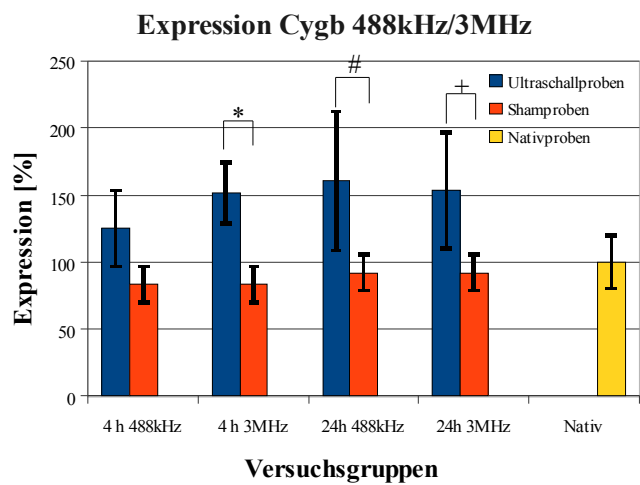


Abbildung 3-54

Abbildung 3-49: Expression von *Nrf2* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h und 24 h nach Ischämieinduktion) in absoluter Kopienzahl. Der Unterschied zwischen den Gruppen 1,5 h Ischämie zu 4 h und 24 h Ischämie (*p = 0,05; #p < 0,05).

Abbildung 3-50: Expression der *SOD-1* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (*p < 0,05).

Abbildung 3-51: Expression der *SOD-2* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (*p = 0,01).

Abbildung 3-52: Expression der *Hmox* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 4 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (*p < 0,05, #p < 0,05).

Abbildung 3-53: Expression der *Ngf* nach induzierter Ischämie

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Ischämiegruppen (1,5 h, 4 h, 24 h nach Ischämieinduktion und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikante Unterschied in der Expression der 1,5 h und 24 h Gruppe in Bezug auf die nativen Proben gemessen (*p < 0,05, #p < 0,05).

Abbildung 3-54: Expression von *Cygb* nach Ultraschallbehandlung (488 kHz und 3 MHz)

Die Abbildung zeigt die Expressionswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (4 und 24 h nach 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung, Sham und nativ) in Prozent bezogen auf die Expression der nativen Proben. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Expression der 24 h Gruppen nach einer 488 kHz- und der 4 h und 24 h Gruppe nach einer 3 MHz-Behandlung in Bezug auf die dazugehörige Shamgruppe gemessen (*p = 0,001, #p < 0,05; +p = 0,05).

3.4 Genexpressionsmessung mittels Mikroarray

3.4.1 Versuchsaufbau

Gruppenaufteilung:

Es wurde je eine Probe aus den Schall- bzw. Kontrollgruppen selektiert und nach der Markierung mit verschiedenen Farbstoffen auf den Operon Chip hybridisiert. Es wurden verschiedene Hybridisierungsstationen getestet, die Auswertung der OpArrays fand an verschiedenen Scannern statt.

3.4.2 Ziel der Studie

Die Basis für diese Experimente sind die Messungen der qRT-PCR. Durch die Messungen wurde die Homogenität der Proben überprüft, so dass stark abweichende Proben detektiert und ausgeschlossen werden konnten. Die selektierten Proben wurde dann für die Chips vorbereitet und gemessen. Zunächst wurde versucht, mit OperonArrays und der Hilfe des Pharmakologischen Instituts (AG Prof. Kleinert/Mainz) die Mikroarray-Studie durchzuführen. Hierbei wurden verschiedene Protokolle appliziert und an verschiedenen Geräten gearbeitet (Hybridisierungsgeräte und Scanner). Parallel hierzu wurden die gleichen RNA-Proben an der HDMA Core-Facility/AG Sahin/Türeci abgegeben und dort mit der Affymetrix-Technik analysiert.

3.4.2.1 Ergebnisse der Operon-Mikroarray-Versuche

Wie bereits unter dem Punkt 2.14 MikroArray Analysen wurden die Mikroarrays nach Herstellerangaben hybridisiert. Die Intensität der Spots war allerdings so gering, dass keine Auswertung der Arrays vorgenommen werden konnte. Das Abändern des Protokoll, die Verwendung verschiedener Hybridisierungsstationen und Array-Scanner konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis herbeiführen. Daher soll hier nicht weiter auf die Auswertung der Operon Arrays eingegangen werden. Die technischen Aspekte wurden in der Diplomarbeit von Herrn Dipl.biol. Andrej Fabrizio ausführlich dargelegt (Andrej Fabrizio, 2009).

3.4.2.2 Ergebnis der Affymetrix-Mikroarrays

Die Auswertung der Affymetrix Mikroarrays durch die HDMA Core-Facility ergab für den Zeitpunkt 4 h eine Menge von 57 differentiell regulierte Genen, welche mindestens 2 fach

reguliert waren (0,2% aller gemessenen Gene) und für den Zeitpunkt 24 h eine Menge von 194 (0,68% aller gemessenen Gene). Hierbei wurden nach 4 h etwa gleich viele Gene hoch, sowie runter reguliert. 24 h nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung wurden 21 Gene als hochreguliert und 173 Gene als herunterreguliert detektiert (Abb. 3-55). Ausgewertet wurden die Gene, die auf beiden Chips als reguliert repräsentiert waren. In der Auswertung der Daten wurde eine Kategorie vergeben mit present on min. 1 chip (nur auf einem Chip präsent). Diese Kategorie wurde nicht zur weiteren Auswertung herangezogen, da keine Wiederholungsexperimente vorlagen. Zum Vergleich wurden zwei interessante Kandidatengene aus dieser Kategorie selektiert und mit Hilfe der qRT-PCR überprüft. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Daten der MikroArray Experimente statistisch nicht repräsentativ sind, da mindestens drei biologische Replikate für eine statistische Evaluation nötig sind, jedoch aus Kostengründen nur eine Probe analysiert wurde.

Zunächst sollen die Daten der 4 h Arrays ausgewertet werden. Von den 27 hochregulierten Genen ließen sich 12 (44,4%) in der Datenbank wiederfinden. Alle anderen sind zwar nach ihrem Locus beschrieben, über ihre Funktion ist allerdings in den Datenbanken keine Information erhältlich. Bei den 30 runterregulierten Genen sind in der Literatur 11 (36,67%) beschrieben, jedoch von den beschriebenen 11 Genen noch 4 als „*predicted*“ eingetragen. Für weitere Untersuchungen konnten keine interessante Kandidatengene aus den Daten ermittelt werden. Die Daten der 24 h Arrays ergaben eine Vielzahl von Expressionsunterschieden. Hier waren 173 Gene herunter und 21 hochreguliert worden. Von den runterregulierten Genen waren 53 (30,64%) Gene bekannt und beschrieben (8 davon als „*predicted*“ eingetragen). Hier fanden sich einige Gene, die entweder bereits per qRT-PCR untersucht wurden (*hsp9 similar to hsp 70 und akt 1*) oder für weitere Untersuchungen als neue Kandidatengene herangezogen wurden (siehe Ergebnisse 3.5 Selektion einiger Kandidatengene aus den MikroArray Daten). Von den hochregulierten Genen waren 8 (38,1%) beschrieben, jedoch 3 davon als „*predicted*“ notiert.

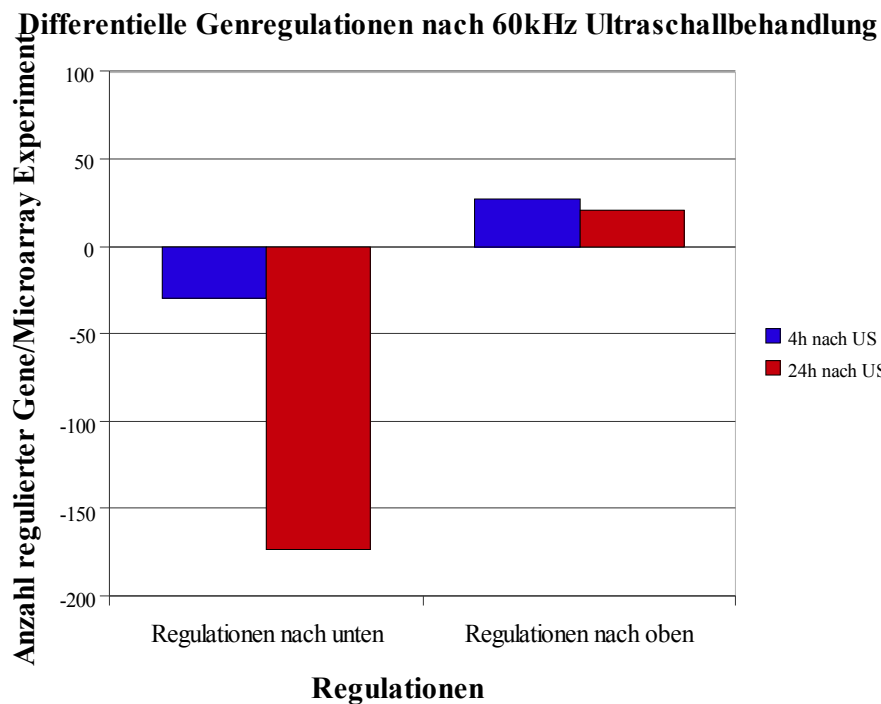


Abbildung 3-55: Anzahl der Genregulationen nach 60 kHz Ultraschallbehandlung

Die positiven Balken bezeichnen die Menge an Genen, welche hochreguliert wurden und die negativen Werte bezeichnen die Menge an Genen, welche runter reguliert wurden.

3.4.2.2.1 Eingruppierung der regulierten Gene

Die weitere Auswertung der Mikroarray-Daten erfolgte nach Eingruppierung der einzelnen Gene in funktionelle Cluster. Es wurde ähnlich wie zuvor bei den qPCR-Daten in verschiedene Funktionen wie Apoptose, Angiogenese etc. unterschieden. War ein Gen mit dem Zusatz „*predicted*“ versehen, so wurde es nicht in eine Kategorie einsortiert, sondern unter „Sonstige“ aufgeführt. Etwa 50% der messbaren Genregulationen fielen zu beiden Zeitpunkten in die Kategorie „Sonstige“. In dieser Kategorie wurden weiterhin die Gene eingeteilt, deren Funktion bislang unklar ist bzw. nicht direkt in Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen gebracht werden konnte.

Es wurde wie zuvor mit der Methode der qPCR zwei Zeitpunkte untersucht: 4 h und 24 h. Der Anteil der Kategorie „Sonstige“ betrug 4 h nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung ca. 65%. Der restliche Anteil der Gene ließ sich in vier Kategorien unterteilen: Apoptose (~ 5,3%), Membranassoziierte Proteine (~ 10,5%), Transkriptionsfaktoren (~ 10,5%) und Stoffwechsel (~ 5,3%) (Abb. 3-56).

Funktionelle Einteilung der Gene

4h nach 60kHz US

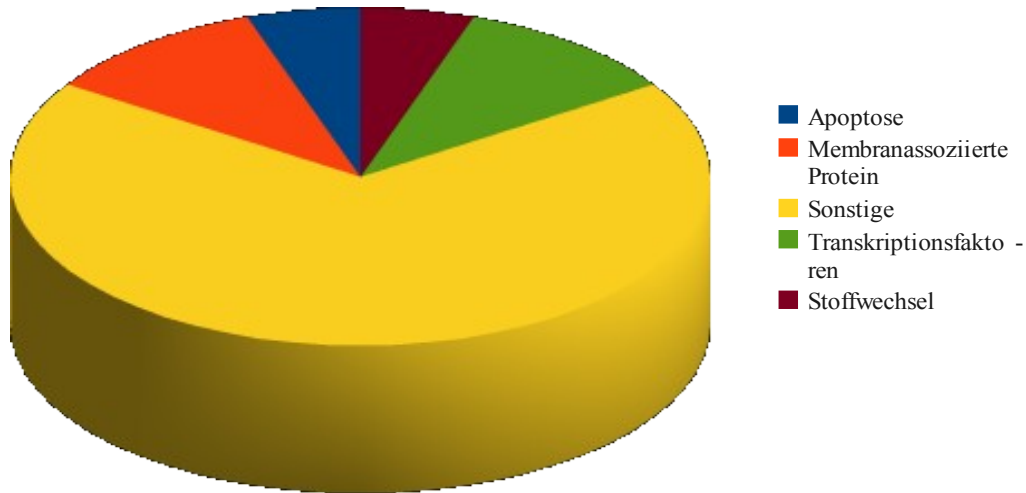


Abbildung 3-56: Funktionelle Einteilung der Genexpression (4 h)

Vierundzwanzig Stunden nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung zeigten sich mehr Genregulationen als zuvor nach 4 h. Wie bereits 4 h nach der Behandlung sind ca. 11% der regulierten Gene Transkriptionsfaktoren. An nächster Stelle stehen Stressmarker (~9,8%), membranassoziierte Proteine (~ 7,8%), Angiogenesemarker (~ 5,9%) und G-Protein assoziierte Proteine (~ 5,9%). Auf die anderen Kategorien Stoffwechsel, Apoptose, Strukturproteine, Immunsystem, Oxidation/Reduktion und Proliferation entfallen jeweils ~2% der Genregulationen (Abb. 3-57).

Funktionelle Einteilung der Gene

24h nach 60kHz US

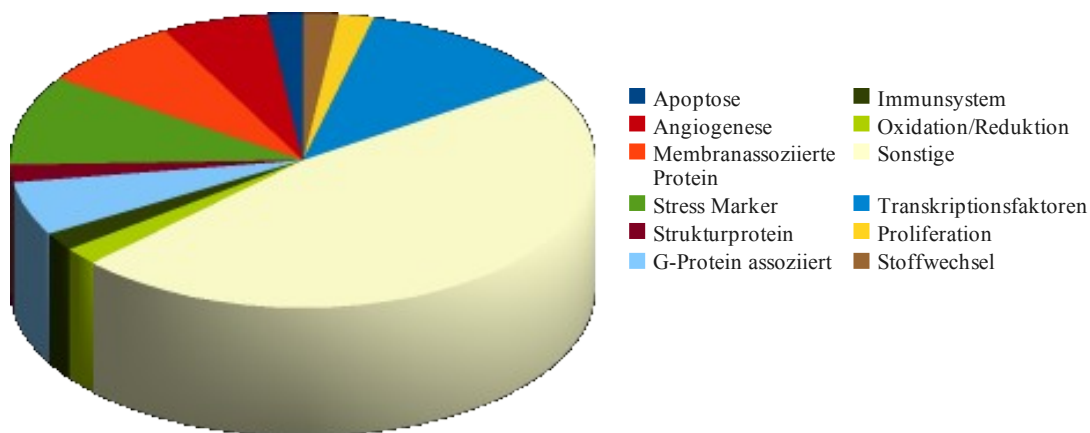


Abbildung 3-57: Funktionelle Einteilung der Geneexpression (24 h)

Die Faktoren, mit denen die Gene aus den verschiedenen Kategorien hoch- oder runterreguliert wurden, beliefen sich um den Wert 2. Lediglich vier Kandidaten waren mit höheren Faktoren reguliert. Diese jedoch konnten keiner Funktion zugeordnet werden und fielen somit unter die nicht weiter analysierte Kategorie „Sonstige“.

3.5 Selektion von Kandidatengen aus den Mikroarray-Daten

3.5.1 Versuchsaufbau

Es wurden zwei Plattendesigns erstellt, je eines für jeden Zeitpunkt. D.h. es wurden alle Proben der Gruppen eines Zeitpunktes auf einer Platte zusammen aufgetragen und mit einer Standardreihe gemessen. Dies ist wichtig, damit die Daten untereinander vergleichbar sind. Der grundsätzliche Versuchsaufbau unterschied sich jedoch nicht von dem unter 3.3 Vergleich der Genexpression genannten.

3.5.2 Ziel der Studie

Die Auswertung der Mikroarray-Daten ergab einige interessante Genregulationen, welche mit Hilfe der qPCR nachträglich in allen experimentellen Gruppen überprüft werden sollten. Hierzu wurde für die qRT-PCR ein neues Plattendesign erstellt, um die Proben der verschiedenen Zeitpunkte nebeneinander betrachten zu können.

3.5.3 qPCR-Verifizierung

Messung der Referenzgene (4 h Design)

Wie bereits beschrieben, wurden hier ebenfalls zunächst die Referenzgene ermittelt, welche für die Normalisierung herangezogen werden können (siehe digitaler Anhang).

Als Referenzgene zur Bestimmung der Normalisierungsfaktoren wurden die Gene *β -aktin* und *Gapdh* ermittelt und über diese die Normalisierungsfaktoren errechnet (siehe digitaler Anhang).

Zusätzlich fiel bei allen Messungen auf, dass die nicht-normalisierten Werte stets das gleiche Expressionsmuster aufwiesen. Die Anzahl der Kopien lag bei den Proben der 60 kHz Sonde und der Kontrollen (Sham-Proben) deutlich unter der der 488 kHz, 3 MHz und nativen Proben (siehe digitaler Anhang). Bei der Messung der Referenzgene wäre zu erwarten gewesen, dass alle Gene in etwa das gleiche Expressionsniveau aufweisen.

Messung der Referenzgene (24 h Design)

Auch für das Plattendesign der Proben nach 24 h wurde das beste Referenzgen bestimmt (siehe digitaler Anhang). Wie bereits beim Plattendesign für die 4 h Proben eignen sich hier die Gene *β -aktin* und *Gapdh* am besten als Referenzgene und wurden zur Bestimmung der Korrekturfaktoren herangezogen (siehe digitaler Anhang). Ähnlich wie bei der Messung der 4 h

Platte fiel hier ein immer wiederkehrendes Expressionsmuster vor der Normalisierung auf. Wie zuvor beschrieben, lag das Expressionsniveau der 60 kHz Proben unter dem Niveau der anderen mitgeführten Proben (digitaler Anhang).

3.5.3.1 Genexpression nach fokaler Ischämie und Ultraschallbehandlung

Vier weitere Kandidatengene wurden aufgrund der Affymetrix Daten selektiert und auf Ebene der qPCR für alle Behandlungen und Gruppenmitglieder erhoben. Deren Funktion und Wirkung auf das zentrale Nervensystem sind hier dargestellt.

Insulin-like growth factor 2 (Igf2)

Isch → 4 h nach Induktion einer fokalen, zerebralen Ischämie konnte mit dem *Igf2*-Assay eine signifikante Erniedrigung (-1,75) der *Igf2*-Expression gemessen werden.

60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die Expressionslevel der Ultraschallproben zeigten keine signifikante Änderung verglichen mit der Kontrollgruppe (Sham) (Abb. 3-62). Für *Igf2* wurden zwei verschiedene Assays designed, da die target-Sequenz der Arrays im UTR lag. Die Auswertung der Messungen ergab ein unterschiedliches Expressionsmuster der unterschiedlichen Assays.

60 kHz → Der UTR-Assay zeigte eine signifikante Expressionsänderung. Hier waren die 60 kHz Proben verglichen mit den Sham-Proben signifikant erniedrigt (-1,62) in ihrer Expression (Abb. 3-63).

24 h nach den unterschiedlichen Behandlungen zeigten sich weder mit dem *Igf2*-, noch mit dem *Igf2*-UTR-Assay signifikante Expressionsänderung zwischen den Gruppen (siehe digitaler Anhang).

Insulin-like growth factor binding protein (Igfbp2)

Isch/60 kHz/488 kHz/3 MHz → 4 h nach verschiedenen Behandlungen (Ultraschall und Ischämie) konnte in der 60 kHz Ultraschallgruppe eine signifikante Erniedrigung (-1,58) der *Igfbp2* Expression detektiert werden (Abb. 3-64).

24 h nach den unterschiedlichen Behandlungen konnte kein Unterschied in den Expressionslevel bestimmt werden (siehe digitaler Anhang).

Interleukin-6-Rezeptor- α (Il6ra)

Isch/60 kHz/488 kHz/3 MHz → Die durchgeführten Experimente zeigten 4 h nach den verschiedenen Behandlungen keine Regulation des Interleukinrezeptors (digitaler Anhang). Nach

24 h allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der Expression (+2,35) in der Ischämiegruppe detektiert werden (Abb. 3-65). Mit Hilfe des UTR-Assays konnte kein *Il6-Rezeptor-Transkript* nachgewiesen werden (digitaler Anhang).

JunD

Isch → Lediglich in der Ischämiegruppe 24 h nach Behandlung konnte eine signifikante Expressionsänderung (-2,5) nachgewiesen werden (Abb. 3-66).

60 kHz/488 kHz/3 MHz → 4 h nach den verschiedenen Behandlungen, konnte keine Expressionsänderung in den behandelten Gruppen in Vergleich zu Shamgruppe oder Gruppe der nativen Tiere beobachtet werden (digitaler Anhang).

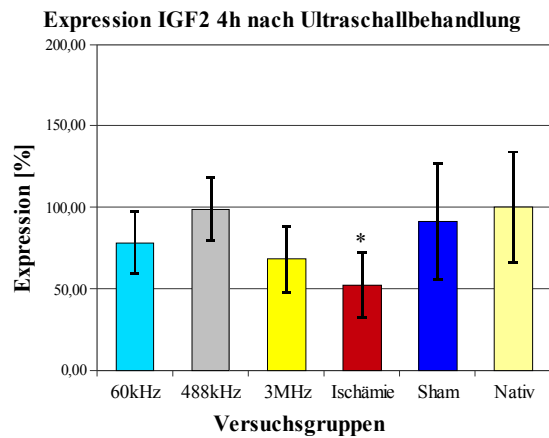


Abbildung 3-58

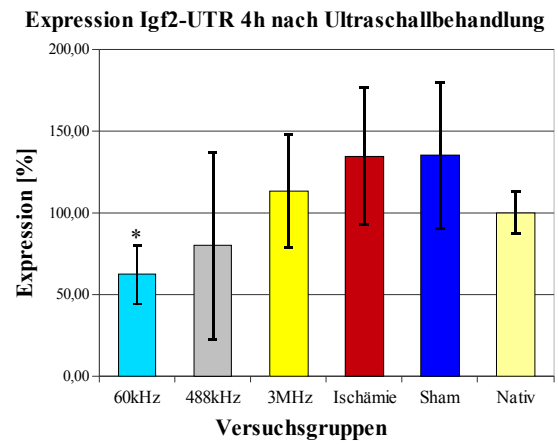


Abbildung 3-59

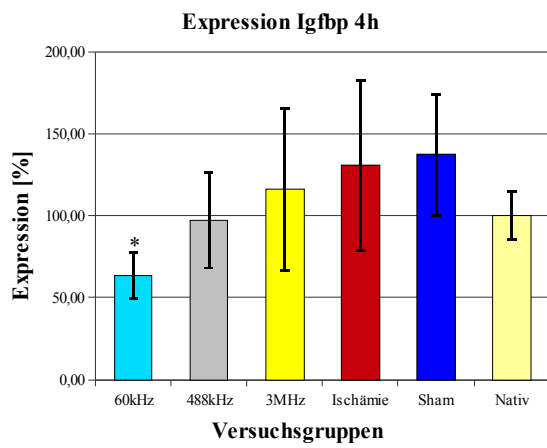


Abbildung 3-60

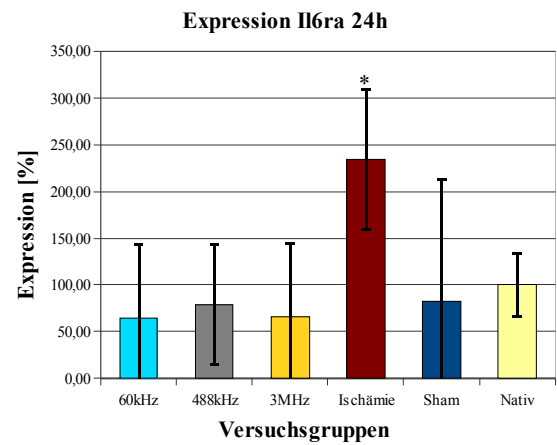


Abbildung 3-61

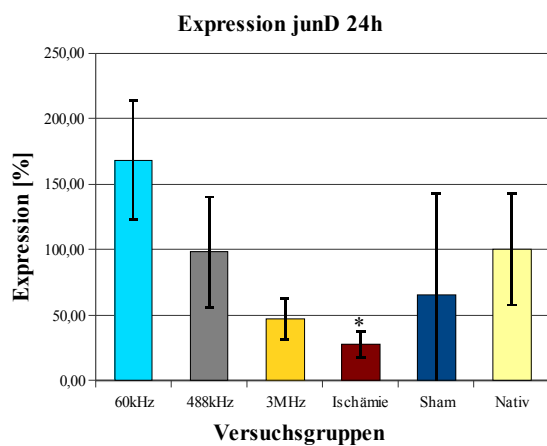


Abbildung 3-62

Abbildung 3-58: Igf2 Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen

Ein signifikanter Unterschied in der Expression wurde zwischen der Ischämiegruppe und der nativen Gruppe gemessen (* $p < 0,05$). Zwischen den Ultraschallgruppen und der Sham-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied bestimmt.

Abbildung 3-59: Igf2-UTR Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen

Die 60 kHz Gruppe unterschied sich signifikant von der Shamgruppe (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-60: Igfbp2 Expression 4 h nach unterschiedlichen Behandlungen

Die 60 kHz Gruppe unterschied sich signifikant von der Shamgruppe (* $p < 0,05$).

Abbildung 3-61: Il6ra Expression 24 h nach unterschiedlichen Behandlungen

Die Expression der Ischämiegruppe unterschied sich signifikant von der Gruppe der nativen Tiere (* $p = 0,01$).

Abbildung 3-62: JunD Expression 24 h nach unterschiedlichen Behandlungen

Die Expression der Ischämiegruppe unterschied sich signifikant von der Gruppe der nativen Tiere (* $p < 0,01$).

3.6 *Ausschlusskriterien für die Experimente*

3.6.1 *Ultraschallstudien*

Durch die Verwendung des Fadenmodells kann es modellbedingt zu einer Entwicklung von subarachnoidaler Blutungen kommen. Tiere mit einer solchen Blutung wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenso kam es zum Ausschluss aus der Studie, wenn das zeitliche Protokoll nicht eingehalten werden konnte.

3.6.2 *Genexpressionsmessungen*

Alle Messungen, die die angegebenen Qualitätsstandards erfüllten, wurden in der Auswertung mit berücksichtigt.

4 Diskussion:

4.1 60 kHz Ultraschall vergrößert das Ischämievolumen im Reperusionsmodell und führt zu einer Hörschädigung bei Ratten

Im Verlauf dieser Studie wurde die Wirkung von 60 kHz Ultraschall auf ischämisches Gehirngewebe bei Ratten untersucht. Der niederfrequente Ultraschall kam mit einer Leistung von 0,2 W/cm² und einem Duty Cycle von 50% zum Einsatz. Hierbei wurde nicht nur die Wirkung bei permanenter Gefäßokklusion, sondern auch bei reperfundiertem Gewebe dokumentiert.

Die erhobenen Daten sind von großer Bedeutung für die potenzielle Entwicklung niederfrequenten therapeutischen Ultraschalls. Bisherige *in vitro* Daten hatten eine gute Effektivität niederfrequenten Ultraschalls nachweisen können (Behrens *et al.*, 2001; Nedelmann *et al.*, 2005). Die Daten dieser Studie sprechen aufgrund der Sicherheitsbedenken jedoch eindeutig gegen eine direkte Anwendbarkeit niederfrequenten Ultraschalls beim Menschen. Insbesondere zeigen sie die Bedeutung einer präklinischen tierexperimentellen Sicherheitsevaluation neuer Ultraschalltherapieverfahren auf. Diese Bedeutung wird unterstrichen durch Ergebnisse einer klinischen Schlaganfallstudie mit 300 kHz Ultraschall (TRUMBI Studie von (Daffertshofer *et al.*, 2005)). Diese Studie, in der 14 Patienten mit nachgewiesenem Verschluss der *Arteria cerebri media* mit rtPA in Kombination mit einem niederfrequenten (300 kHz) Therapiegerät behandelt worden waren, musste vorzeitig wegen gravierender Nebenwirkungen (intrazerebrale Blutungen) abgebrochen werden.

Erste Tierversuche mit niederfrequentem Ultraschall einer anderen Einstellung (20 kHz) erzielten ähnliche Ergebnisse wie die vorliegenden Daten. Es konnte gezeigt werden, dass die Schädigung durch 20 kHz Ultraschall dosisabhängig ist und auch an gesundem Gewebe auftritt (Schneider *et al.*, 2006; Wilhelm-Schwenkmezger *et al.*, 2007).

4.1.1 Auswirkungen der Ultraschallbehandlung auf das neurologische Ergebnis, das Hörvermögen und die Mortalität

Nach permanenter Okklusion der *Arteria cerebri media* führte eine transkranielle Behandlung mit niederfrequentem Ultraschall im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikant schlechteren Ergebnis. Als wesentliches Merkmal fand sich bei der Analyse der funktionellen Testung eine auftretende Hörminderung nach erfolgter Ultraschallbehandlung. In der

Reperfusiongruppe, die mit Ultraschall behandelt wurde, war bei einem Drittel der Tiere eine Hörminderung nachweisbar. Dies ist die erste Studie, die auf die Möglichkeit von unerwünschten Wirkungen von Ultraschall am Hörsystem hinweist. Zumal sich die verwendete Frequenz deutlich außerhalb des menschlichen, hörbaren Bereichs befindet. Die Mechanismen, die zu dieser Hörschädigung geführt haben, sind derzeit unklar. In einem Nachfolgeprojekt dieser Arbeit soll das Innenohr von Ratten, die eine ultraschallinduzierte Hörminderung aufweisen, näher untersucht werden. Zu diskutieren sind ein direkt mechanischer oder ein thermischer Effekt. Beides erscheint möglich, insbesondere, da das Innenohr als knochenahes Organ in besonderem Maße Effekten exponiert sein könnte, die an der Knochen/Weichteilgrenze auftreten können (z.B. Überlagerungen von Ultraschallwellen). Hierbei könnte es sich um einen rattenspezifischen/modellspezifischen Effekt handeln, da die Frequenz von 60 kHz noch im hörbaren Bereich der Ratte liegt (Oliver Schleif, 2001).

Die Mortalität der mit Ultraschall behandelten Tiere war ebenfalls erhöht. Signifikant war dieser Unterschied zwischen den Gruppen mit permanentem Verschluss ($p = 0,04$). Diese Beobachtung ist ein Indiz für die stark schädigende Wirkung von niederfrequentem Ultraschall. Die histologische Auswertung gab weitere Hinweise auf die Ursache der erhöhten Mortalität dieser Versuchsgruppe.

4.1.2 Vergrößerung der Läsion durch die Ultraschallbehandlung

Als weiteres, wesentliches Ergebnis dieser Arbeit fand sich eine Zunahme des ischämischen Läsionsvolumens nach Ultraschallbehandlung. Dieser Effekt zeigte sich in besonderem Maße und mit statistischer Signifikanz bei den Tieren, die vor der Behandlung einer Reperfusion der ACM unterzogen worden waren. Im Vergleich dazu unterschieden sich die Ischämievolumina der Tiere nach permanentem Verschluss nicht voneinander. Es ist davon auszugehen, dass im Reperfuptionsmodell (im Gegensatz zur permanenten Okklusion) ein erheblicher Teil der Ischämie, die Penumbra, durch die Beendigung des Gefäßverschlusses überleben kann. Dies findet durch die wesentlich kleinere Infarktgröße im Reperfuptionsmodell seinen Ausdruck (Ginsberg, 2003). Diese Penumbra ist sehr empfindlich gegenüber pathophysiologischen Einflüssen (Capes *et al.*, 2001; Hajat *et al.*, 2000). Möglicherweise liegt hierin der Grund für die Zunahme der Infarktgröße durch Anwendung von niederfrequentem Ultraschall. Konkret gesprochen führte die Ultraschallbehandlung zu einer bedingten Schädigung der Penumbra, was wiederum zu einem irreversiblen Zelluntergang führt. Die Ergebnisse zeigen, dass Ultraschallanwendungen insbesondere am ischämisch vorgeschädigten Gehirn, mit großer

Vorsicht durchzuführen sind. In jedem Falle bedarf eine Neueinführung therapeutischer Ultraschallsysteme eine zuvor durchgeführte gründliche Sicherheitsevaluation.

Die histologische Auswertung der Daten zeigte ferner als mögliche zusätzliche Ursache der erhöhten Mortalität in einigen der Tiere eine intrazerebrale oder subarachnoidale Blutung. Intrazerebrale, umschriebene Einblutungen und über der Hemisphäre liegende Subarachnoidalblutungen fanden sich ausschließlich bei mit Ultraschall behandelten Tieren. Leichte hämorrhagische Transformationen, wie sie im Rahmen einer Ischämie gelegentlich entstehen, zeigten sich sowohl in den Ultraschall- als auch in den Kontrollgruppen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten hingegen keinen Hinweis auf einen mechanischen Schaden des Ultraschalls im behandelten Gewebe. Es kamen verschiedene Marker zum Einsatz (MAP2, c-fos; GFAP, CD68). All diese Marker zeigten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Versuchsgruppen, wonach eine Schädigung in den beschriebenen Bereichen auszuschließen ist. Demnach wird durch Ultraschall keine Schädigung der beschriebenen Strukturen verursacht. Die schädigenden Mechanismen müssen folglich anderen Ursprungs sein, was es in folgenden Studien zu belegen gilt.

4.1.3 Effiziente intrakranielle Temperaturkontrolle durch Verwendung eines Ultraschall-Intervallschemas

Die thermische Wechselwirkung von Ultraschall mit behandeltem Gewebe kann Schäden nach sich ziehen, wie bereits in tierexperimentellen Studien gezeigt werden konnte (Horder *et al.*, 1998). Prinzipiell ist eine Temperaturerhöhung des Gehirns als unerwünschte Wirkung anzusehen. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass transkranieller therapeutischer Ultraschall ohne relevante Änderungen der Hirntemperatur eingesetzt werden kann (Fatar *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2006). Die letztgenannten Studien wurden zum einen an gesundem Gehirngewebe durchgeführt und zum anderen waren die Messungen der Temperatur tympanal vorgenommen worden und repräsentieren somit nicht genau die intrakraniellen Verhältnisse. Auch wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass zur sicheren Vermeidung eines intrakraniellen Temperaturanstiegs mitunter ein Kühlsystem in die Vorlaufstrecke des Ultraschallfeldes integriert werden muss. Da dies aber für die Schallanwendung mitunter zu einem komplizierteren Gerätedesign führt und letztlich eine Temperaturkontrolle in tieferen Hirnregionen nur schwer zu realisieren ist, wurde in der vorliegenden Studie für die Versuchsreihen ein Intervallschema verwendet, das regelmäßige Schallpausen vorsieht. In den Temperaturversuchen wurde dieses Schema mit einer kontinuierlichen Behandlung verglichen. Hierzu wurde die Temperatur über einen im Ischämieareal platzierten Messfühler intrakraniell

gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass sich bei intermittierender Verwendung des Ultraschalls kein nennenswerter Temperatureffekt im Gewebe einstellt. Es ergibt sich hieraus also die Möglichkeit einer effektiven Temperaturkontrolle während einer Ultraschallbehandlung. Auch lässt sich daraus schließen, dass Temperatureffekte für die schädigenden Wirkungen auf ischämisches Gewebe vermutlich nicht verantwortlich sind. Nicht sicher auszuschließen sind allerdings mögliche umschriebene Temperaturspitzen z.B. an Grenzflächen zwischen Geweben unterschiedlicher Schallimpedanz, wie dies an der Knochen/Gewebegrenze der Fall ist.

4.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Da die beobachteten unerwünschten Wirkungen bereits bei einer geringen Intensität aufgetreten sind, erscheint eine klinische Anwendung nicht unmittelbar realisierbar. Die histologischen Untersuchungen ergaben intrazerebrale und subarachnoidale Blutungen. Die verwendeten Tiermodelle, insbesondere das Reperusionsmodell, haben sich als sehr sensitiv für die Erfassung solcher ultraschallbedingten Nebenwirkungen erwiesen. Da eine möglichst exakte Charakterisierung auch der unerwünschten Bioeffekte für die Entwicklung des therapeutischen Ultraschalls von Bedeutung ist, sollten weitere Studien unternommen werden, um die Ursachen für die schädigende Nebenwirkungen näher zu beschreiben. Ein Augenmerk sollte hierbei auf den zugrunde liegenden Mechanismen liegen. Eine mögliche Nebenwirkung könnte die Entstehung von Kavitationen sein, welche wiederum zur Bildung freier Radikale führen (Fowlkes *et al.*, 2000). Dies wäre in folgenden Versuchen nachzuweisen.

Des Weiteren können die Tiermodelle dazu eingesetzt werden, die Effekte einer Modifikation technischer Parameter an den Schallgeräten zu evaluieren. So wäre denkbar, dass nicht die Frequenz als solches, sondern die Kombination der verschiedenen Ultraschallparameter zu diesen ungünstigen Effekten beigetragen hat. In erster Linie sind hier neben der Intensität und der Gesamt-Expositionszeit jene Faktoren zu nennen, die bei einer gepulsten Ultraschallanwendung von Bedeutung sind. Hierzu gehören die Pulsrepetitionsfrequenz und der Duty Cycle (Meunier *et al.*, 2007).

4.2 Eine Schädigung ischämischen Gehirngewebes durch 60 kHz Ultraschall ist abhängig vom Duty Cycle

Die vorangegangene Studie konnte zeigen, dass niederfrequenter (60 kHz) Ultraschall in den gewählten Einstellungen zusätzlich schädigende Wirkung auf ischämisches Hirngewebe ausübt. Auf Grund der Analyse der Läsionsvolumina in Tieren mit permanenter Okklusion und nach

Reperfusion ist von einem schädigenden Einfluss auf die Penumbra auszugehen. In dieser Studie sollte evaluiert werden, ob sich durch Änderung der technischen Parameter des Ultraschalls diese unerwünschten Wirkungen minimieren lassen. Wie unter 4.1.4 dargelegt wurde, kommt dem Duty Cycle bei gepulsten Anwendungen möglicherweise eine besondere Rolle zu. Bei längeren Duty Cycle-Einstellungen lassen sich bei gleichbleibender zeitlich gemittelter Intensität Schallspitzendrücke im Puls reduzieren. Eine *in vitro* Studie hatte gezeigt, dass ein längerer Duty Cycle mit verbesserter Thrombolyse einhergeht (Meunier *et al.*, 2007). In der aktuellen Studie sollte daher die Wirkung des Duty Cycles auf das ischämische Hirngewebe untersucht werden. Ein weiterer Studienarm beschäftigte sich mit der Auswirkung des Ultraschalls auf das Gehör der Ratte, welche in Kooperation mit der HNO-Klinik/Mainz durchgeführt wurde. Hierbei sollten die Beobachtungen aus der vorangegangenen Studie reproduziert werden und die schädigende Wirkung des niederfrequenten Ultraschalls am Innenohr quantifiziert werden.

4.2.1 Neurologische Beurteilung und Hörminderung nach Ultraschallbehandlung

Die Auswertung der neurologischen Daten ergab eine signifikant schlechtere Beurteilung der Tiere, die mit einem kurzen Duty Cycle (und somit höheren Spitzendrücken im Puls) behandelt worden waren ($0,1 \text{ W/cm}^2$; Duty Cycle 20% verglichen mit der Kontrollgruppe $p = 0,01$). Sowohl bei einer Verlängerung des Duty Cycles auf 80% (bei gleicher zeitlich gemittelter Intensität), als auch eine Reduktion der Intensität auf $0,05 \text{ W/cm}^2$ (Duty Cycle 20%) führten dagegen zu keiner Verschlechterung des Behandlungsergebnisses im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der geringere Duty Cycle wurde gewählt, da bislang keine Daten über die Gewebeverträglichkeit unterschiedlicher Duty Cycle existierten. Möglicherweise wäre ein geringerer Duty Cycle zwar mit höherer Leistungsamplitude, aber größeren Pausen gewebeverträglicher. Diese Vermutung stellte sich jedoch als falsch heraus.

Auch in dieser Studie konnte eine vermehrte Schwerhörigkeit bei den Tieren beobachtet werden. Signifikanz erreichte dies bei den mit kurzem Duty Cycle behandelten Tieren ($0,1 \text{ W/cm}^2$, Duty Cycle 20%). Hier waren es immerhin 62,5% aller Tiere, welche eine Hörminderung erlitten. 25% der Tiere in den anderen Ultraschallgruppen war schwerhörig, was sich mit den Daten der vorangegangenen Studie deckt. Dort waren 33% der Tiere schwerhörig. Somit ist die Hörminderung durch 60 kHz Ultraschall reproduzierbar und zeigt sich, entgegen den Auswirkungen auf das Ischämievolumen, nicht als vom Duty Cycle abhängig.

Eine Quantifizierung des Hörvermögens mittels akustisch evozierter Potenziale wurde an gesunden Tieren (ohne Induktion einer Ischämie) vorgenommen. Hier konnte ebenfalls bei ca. 25% der Tiere eine Hörminderung von bis zu 40 dB gemessen werden.

4.2.2 Läsionsentwicklung nach Ultraschallbehandlung und histologische Auswertung

Das Läsionsvolumen war nach den unterschiedlichen Ultraschallbehandlungen und einem DC von 20% signifikant erhöht ($0,05 \text{ W/cm}^2 - p = 0,04$; $0,1 \text{ W/cm}^2 - p = 0,02$). Die Läsionen der Tiere aus der Gruppe behandelt mit 80% DC hatten dagegen kein signifikant erhöhtes Läsionsvolumen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Entwicklung der Läsion mit sinkendem Duty Cycle zunimmt. Erklärt werden kann dies durch die Amplitude der Ultraschallwelle bei unterschiedlichen Duty Cycles (siehe 1.6 Ultraschall). Wird der Duty Cycle verkürzt, kommt es zu einem Anstieg der Amplitude, also zu höheren Leistungsspitzen. Demnach ist das Gewebe mehr Energie ausgesetzt, als vergleichsweise bei höherem Duty Cycle.

Eine Versuchsgruppe wurde mit cw-Ultraschall behandelt, jedoch überlebte keines dieser Tiere die Versuchsdauer von 24 Stunden. Grund hierfür war das Entstehen von Subarachnoidalblutungen, die zwar nicht immer tödlich war, aber zum Ausschluss der Tiere von den Versuchsreihen führten. Doch nicht nur diese Versuchsgruppe zeigte eine signifikant höheres Auftreten von Subarachnoidalblutungen. Auch in der Gruppe behandelt mit $0,1 \text{ W/cm}^2$ und 20% DC zeigte sich eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit einer solchen Blutung verglichen mit den Kontrollen. Hierzu ist zu ergänzen, dass eine Begleiterscheinung des Fadenmodells eine Subarachnoidalblutung sein kann (Gerriets *et al.*, 2004). Es gibt sogar ein Modell für Subarachnoidalblutung, welches vom Fadenmodell abgeleitet wurde (Park *et al.*, 2008). Jedoch sind in der Kontrollgruppe keine solchen Blutungen aufgetreten. Die Auswertung der HE-Färbung ergab, dass in der cw-Gruppe die Subarachnoidalblutung nicht durch das Modell verursacht wurde, da keine der typischen Gewebeschäden beobachtet werden konnten. Von diesen Tieren abgesehen, gab es keine erhöhte intrakranielle Blutungsrate in den ultraschallbehandelten Gruppen (Auswertung durch die Abteilung für Neuropathologie/Mainz). Blutungen können folglich als Ursache für die Läsionsvergrößerung ausgeschlossen werden.

Die Mortalitätsrate unterschied sich lediglich in der cw-Ultraschall-Gruppe deutlich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Eine mögliche Erklärung wäre, dass zwar die Leistungsspitzen bei cw-Ultraschall wegfallen, jedoch keine zusätzliche Schallpause entsteht, welche dem Gewebe zur Regeneration dienen könnte. Hier wurde allerdings das übliche Beschallungsprotokoll gewählt, welches nach einer 2minütigen Beschallungszeit eine Pause vorsieht. Die genaue Ursache für diese Ergebnisse bleibt nach dieser Studie noch unklar und sollte in weitergehenden Studien geklärt werden.

4.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Das Resultat dieser Studie legt nahe, dass die schädigende Wirkung des Ultraschalls mit längerem Duty Cycle abnimmt, insofern nicht mit cw-Ultraschall gearbeitet wird. Mit steigendem Duty Cycle steigt auch die thrombolytische Wirkung des Ultraschalls (Meunier *et al.*, 2007). Demnach sollten folgende Studien mit höheren Duty Cycle arbeiten, da nicht nur die thrombolytische Eigenschaft des Ultraschalls (Meunier *et al.*, 2007), sondern auch seine Gewebeerträglichkeit erhöht wird. Auf die hörmindernde Wirkung des 60 kHz Ultraschalls scheint der Duty Cycle keine Wirkung zu haben, da die Messung der Hörschwelle keinen Unterschied zwischen den behandelten Gruppen aufzeigen konnte.

Da die Verwendung des Fadenmodells zur Ausbildung von subarachnoidalen Blutungen führen kann, wäre es möglich, dass das Gewebe basal des Gehirns durch das Einführen eines Fadens ins Lumen angegriffen wird. Die physikalischen Eigenschaften des Ultraschalls könnten in der Folge dazu führen, dass gereizte Gefäße schneller reißen und es infolge dessen zu Blutungen kommen kann. Verstärkt werden könnte dieser Effekt noch durch die Gabe von blutverdünnenden Pharmaka wie beispielsweise rt-PA. Die Wahl eines anderen Ischämie-modells, wie z.B. von Krüger und Busch (Krueger *et al.*, 2002) könnte eine modellbedingte Nebenwirkung ausschließen und gleichzeitig über die thrombolytischen Eigenschaften des Ultraschalls Aufschluss geben.

4.3 Differenzielle Genexpression nach Anwendung verschiedener Ultraschallsonden – Zahlreiche Effekte bei 488 kHz nachweisbar

Da bislang keine Ursachen für die schädigende Wirkung von niederfrequentem (60 kHz) Ultraschall gefunden werden konnten, sollte die Wirkung von Ultraschall auf die Genexpression im zerebralen Kortex untersucht werden. In der Literatur existierten zu Beginn meiner Arbeit keine Daten über den Einfluss von Ultraschall auf die Genexpression im Gehirngewebe. Es gibt jedoch mittlerweile Publikationen, welche die Wirkung von Ultraschall auf z.B. die Wundheilung/Knochenheilung mit molekular-biologischen Techniken nachgewiesen haben.

Zur Durchführung der Studie standen mehrere Ultraschallsonden zur Verfügung, die in ihrer Wirkung auf die Genexpression verglichen werden sollten. Die Einstellung der 60 kHz Sonde wurde gemäß der Ultraschallstudie (Nedelman *et al.*, 2008b) verwendet, um ggf. die schädliche Wirkung des Ultraschalls auf Genebene zu identifizieren. Die zweite getestete Sonde mit einer Frequenz von 488 kHz ist ebenfalls eine experimentelle Sonde, deren Wirkung bereits *in vivo* getestet wurde und keine signifikanten Schäden nach zerebraler Ischämie verursachte (Saguchi *et al.*, 2008). Die dritte zu vergleichende Sonde ist eine Duplex-Sonde (3 MHz), die im klinischen, diagnostischen Einsatz ist und keine Nebenwirkung auf Gehirngewebe gezeigt hatte (Eggers *et al.*, 2008).

Als positive Kontrollen wurden die Assays zur Messung der Genexpression ebenfalls auf ischämische Proben getestet. Deren Ergebnisse sollen zuerst diskutiert werden, um die Validität der designten Assays zu belegen. Im Anschluss daran folgt die Diskussion der Ultraschalldaten.

4.3.1 Messung der Genexpression bei fokaler, zerebraler Ischämie: Vergleich mit Literaturdaten

Die Expressionsmessungen der Gene unter ischämischen Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten eine Vielzahl von Veränderungen, welche mit der im großen Umfang vorhandenen Literatur korreliert werden können. Alle Regulationen sind der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

| | | Gen | Ischämie | | |
|----------------------------|--------------|--------------|----------|--------|-------|
| | | | 1,5h | 4h | 24h |
| Apoptose-Kandidatengene | pro | <i>Tnf-α</i> | | | |
| | | <i>Casp3</i> | | | |
| | | <i>Casp9</i> | -1,95 | -2,07 | |
| | | <i>AiF</i> | | -1,43 | |
| | anti | <i>bcl-2</i> | +1,77 | | |
| | | <i>Akt1</i> | | +1,40 | +1,73 |
| | | <i>Akt2</i> | | | |
| Angiogenese-Kandidatengene | <i>Akt3</i> | | | | |
| | <i>Vegfa</i> | | | | |
| | <i>Egr1</i> | | | | |
| | <i>Efna5</i> | -2,27 | -1,60 | | |
| | <i>Egfr</i> | | | +2,32 | |
| | <i>Ang1</i> | | | | |
| Stress-Marker | <i>Ang2</i> | | | +7,15 | |
| | <i>hsp27</i> | | | +21,88 | |
| | <i>hsp70</i> | | | +3,92 | |
| | <i>C-fos</i> | | | | |
| | <i>Jun</i> | | +1,66 | +2,21 | |
| | <i>Nrf-2</i> | | +1,90 | +2,54 | |
| | <i>SOD-1</i> | -2,90 | | | |
| | <i>SOD-2</i> | | | +3,47 | |
| Globine / NOS | <i>Hmox</i> | | +17,14 | +67,35 | |
| | <i>Cygb</i> | | | | |
| | <i>Ngb</i> | +1,52 | | -1,96 | |
| | <i>nNOS</i> | +1,47 | | +2,23 | |
| | <i>eNOS</i> | -2,66 | | +3,87 | |
| | <i>iNOS</i> | -2,34 | | +10,45 | |

Tabelle 4-1: Genregulationen nach ischämischen Ereignis

Insgesamt wurden 27 Gene im ischämischen, zerebralen Kortex gemessen. Von diesen waren 8 Gene innerhalb von 90 min. nach der Okklusion als reguliert detektiert worden. Sieben Gene waren 4 h nach Ischämie reguliert und 13 Gene nach 24 h. Die grünen Zahlen markieren Regulationsfaktoren, welche die Genregulation als hoch reguliert definieren. Die roten Zahlen zeigen herunter regulierte Faktoren. Die blau markierten Regulationsfaktoren beziehen sich auf die Daten der 1,5 h Messung, da hier keine nativen Kontrollen gemessen wurden. Die Faktoren geben den Wert an, mit welchem der Expressionswert der nativen Proben multipliziert werden muss, um auf den Wert der signifikanten Veränderung zu kommen. Es sind nur Werte in die Tabelle eingetragen, wenn signifikante Regulationen detektiert wurden. Die weißen Felder zeigen an, dass hier keine Regulation nachgewiesen werden konnte.

Es fällt auf, dass zu den frühen Zeitpunkten, 1,5 und 4 h nach induzierter Ischämie, etwa gleich viele Gene (8 bzw. 7 Stück) in ihrer Expression verändert sind. Ein Anstieg an der Zahl der regulierten Kandidaten ist nach 24 h zu verzeichnen. Jetzt sind es bereits 13 Gene, die signifikant reguliert wurden. Diese Daten gehen konform mit anderen publizierten Studien (Hara *et al.* 2001; Büttner *et al.* 2008) Auch die Höhe der Regulationen nimmt mit zunehmender Zeit zu. Nach 1,5 h liegt der höchste Regulationsfaktor bei gerade +1,77 und der niedrigste bei -2,9, Vier

Stunden nach Induktion der Ischämie wächst der höchste Regulationsfaktor auf einen Wert von +17,14 und der niedrigste steigt auf einen Wert von -2,06. Ein Tag nach induzierter Ischämie liegt nun der höchste Regulationsfaktor auf einem Level von +67,35, und es ist nur noch ein Wert signifikant erniedrigt (Ngb: -1,96).

Apoptose

Für *TNF- α* konnte nach fokaler, zerebraler Ischämie in unserem Modell keine Expressionsänderung detektiert werden. Nach Daten in der Literatur steigt nach fokaler und globaler Ischämie am Rattenmodell die Expression von *TNF- α* im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich an (Chang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). In der Arbeit von Wang *et al.* wurde dies jedoch im Hippocampus und nicht im Kortex gemessen. Gleiches gilt für Untersuchungen am menschlichen Gehirn, wo ein Anstieg der *TNF* Expression in der weißen Substanz des Kortex und Subkortex gemessen werden konnte (Sairanen *et al.*, 2001). Da hier in unterschiedlichen Modellen und an teils unterschiedlichen Spezies Untersuchungen vorgenommen wurden, sind die Daten nur bedingt vergleichbar.

In der Gruppe der pro-apoptotischen Marker (*caspase 9* und *AiF*) finden sich alle Kandidaten über alle Zeiträume hinweg als herunterreguliert. Dies erklärt sich dadurch, dass der Organismus versucht der Apoptose entgegen zu wirken. Dies geht konform mit dem Ergebnis der anti-apoptotischen Marker (*bcl-2* und *akt1*), welche eine erhöhte Expression zeigten. Das weniger der von mir ausgewählten Apoptosemarker eine Regulation zeigten, mag daran gelegen haben, dass der Zeitpunkt der Gewebeentnahmen relativ früh erfolgte. Wie Abbildung 1-2 zu entnehmen ist, kommt es erst nach Stunden bzw. Tagen zu einer Zunahme des apoptotischen Prozesses (Dirnagl *et al.*, 1999). Die Daten der Literatur sind auch hier aufgrund der Modellwahl nur bedingt mit den eigenen vergleichbar. Die Modellwahl bestimmt signifikant den Effekt auf das Gehirn: so führt die Reperfusion nach einer Ischämie im Gehirn zu anderen Schäden, als das bei einer permanenten Okklusion der Fall ist (Solenski *et al.*, 2002; Walberer *et al.*, 2006).

Die Expression von *caspase 3* zeigte bei mir keine Änderung an verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie. In der Literatur gibt es den Hinweis, dass nach permanenter, zerebraler Ischämie kein Anstieg von *caspase 3* zu erwarten ist (Colli *et al.*, 2008). Die beschriebenen Untersuchungen wurden jedoch nicht nach Reperfusion durchgeführt und sind daher lediglich als unterstützender Hinweis in Bezug auf die eigenen Daten anzusehen. Des Weiteren ist die Regulierung der *caspase 3* nach fokaler zerebraler Ischämie unterschiedlich in der Literatur beschrieben. Eine andere Arbeitsgruppe hat beispielsweise den stetigen Anstieg der Expression von *caspase 3* ab dem Zeitpunkt 6 h nach ischämischem Insult beschrieben (Harrison

et al., 2000; Harrison *et al.*, 2001). Allerdings ist in beiden Artikeln die fokale Ischämie ebenfalls ohne Reperfusion durchgeführt worden.

Caspase 9 ist ebenso ein pro-apoptotisches Gen, welches nach Hinweisen in der Literatur im Anschluss an ein ischämisches Ereignis herunterreguliert wird (Harrison *et al.*, 2001). Als Modell diente hier ein permanentes Okklusionsmodell. Die eigenen Daten zeigen, dass auch nach fokaler Ischämie und Reperfusion eine signifikante Expressionserniedrigung gemessen werden kann (1,5 h und 4 h nach Ischämie).

Der Faktor **AiF** wirkt unabhängig des Caspase-Signalwegs fördernd auf die Apoptose (Cao *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 1999). 4 h nach induzierter Ischämie konnte eine leichte Erniedrigung des *AiF*-Expressionsniveaus nachgewiesen werden. Ansonsten blieb die Expression von *AiF* nach induzierter Ischämie sehr konstant. Ein Beleg für das Verhalten der *AiF* Expression nach ischämischem Insult fehlt in der Literatur. Es ist jedoch belegt, dass die Hemmung der *AiF*-Expression sich neuroprotektiv auswirkt (Cao *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 1999).

Neunzig Minuten nach induzierter Ischämie konnte ein Anstieg der **bcl-2** Expression beobachtet werden. In der Literatur finden sich keine Hinweise zum Expressionsprofil von *bcl-2* nach fokaler Ischämie. Es wird ihm eine protektive Rolle bei der Behandlung von Ischämien zugeschrieben (Sasaki *et al.*, 2006).

Die anti-apoptotisch wirkenden Gene **akt1-3** sind entscheidend für das Überleben von neuronalen Zellen (Dudek *et al.*, 1997). Jedoch ist bisher wenig bekannt über die genaue Funktion der *akt*-Familie. Es wird jedoch angenommen, dass *akt* eine neuroprotektive Rolle einnimmt. Vier und 24 Stunden nach ischämischem Ereignis konnte in meiner Arbeit ein signifikanter Anstieg der *akt1* Expression nachgewiesen werden. Eine Protein-Studie von Noshita *et al.* 2001 belegt ebenfalls eine vermehrte Expression des *akt1* 4 h nach induzierter Ischämie in der Maus.

Angiogenese

Zhang *et al.* 2000 haben zeigen können, dass **VEGF** protektiv auf die Entwicklung der ischämischen Läsion wirken kann. Dies ist allerdings zeitabhängig, da eine frühe Applikation zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke, Vergrößerung der Läsion und hämorrhagischen Transformation führte. Zu einem späteren Zeitpunkt unterstützt **VEGF** die Angiogenese und verbessert das neurologische Ergebnis. Nach fokaler, zerebraler Ischämie konnte bei den eigenen Messungen keine Änderung der **VEGF**-Expression detektiert werden. Lenmayr *et al.* 2005 untermauern unsere Ergebnisse mit einem vergleichbaren Fadenmodell an Spague Dawley

Ratten. Auch in deren Arbeit wurde keine Expressionsänderung gemessen. Andererseits gibt es auch Publikationen, welche gezeigt haben, dass die Expression nach Ischämie und Reperfusion ansteigt (Hayashi *et al.*, 1997; Kovács *et al.*, 1996).

Die eigenen Messungen zeigen keine signifikante Expressionsänderungen von *Egr1*. Neunzig Minuten nach induzierter Ischämie konnte jedoch eine Aufwärtstendenz detektiert werden, die mit $p = 0,052$ beinahe signifikant war. Nach 4 h war das Expressionslevel auf gleichem Niveau wie bei den nativen Tieren und nach 24 h die Streuung in der Gruppe so groß, dass auch hier kein Unterschied detektiert werden konnte. In der Literatur wird ein steiler Anstieg der *Egr1* Expression 2 Stunden bis 5 Tage nach fokaler, zerebraler Ischämie beschrieben. Diese wurde, wie die eigene, an ausgewachsenen Ratten mit fokaler Ischämie und Reperfusion durchgeführt (Tureyen *et al.*, 2008).

Die Messung der *Ephrin-5*-Expression nach fokaler Ischämie ergab eine signifikante Reduktion der Expression 1,5 h und 4 h nach fokaler Ischämie. Nach subduralem Hämatom ist ebenfalls ein Abfall der Genexpression nachgewiesen worden (Biervert *et al.*, 2001). Dabei laufen zwar andere Prozesse ab, als nach einer fokalen zerebralen Ischämie, dennoch kommt es in dem betroffenen Areal auch zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff und Glukose (Ischämie) (Kwon *et al.*, 2005). Von der Gruppe Carmichael *et al.* 2005 ist der Anstieg von *Ephrin-5* nach induziertem Schlaganfall publiziert. Ergänzend ist zu erwähnen, dass in der Arbeit von Carmichael *et al.* ein permanentes Okklusionsmodell verwendet wurde. Daher sind die Daten bedingt miteinander vergleichbar.

Egfr ist ein wichtiger Rezeptor während des Tumorwachstums, dessen Hemmung das Tumorwachstum inhibiert (West *et al.*, 2008). Die eigenen Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Genexpression von *Egfr* 24 h nach fokaler Ischämie. Planas *et al.* hingegen konnten zeigen, dass die Expression von *Egfr* nach fokaler Ischämie inhibiert wird. Im ischämischen Areal ist ein paar Tage nach induzierter Ischämie nur noch sehr wenig *Egfr* nachweisbar. Diese Abnahme ist allerdings erst vier Tage nach induzierter Ischämie gemessen worden (Planas *et al.*, 1998) und widerlegt somit nicht die eigenen Daten. Die Stimulation von *Egfr* führte zur Neuroprotektion (Justicia *et al.*, 1999), wohingegen das Ausschalten von *Egfr* zu neurodegenerativen Erkrankungen führte (Sibilia *et al.*, 1998).

Die *Angiopoietine 1* und *2* (*Ang1* und *2*) bilden mit *VEGF* eine funktionelle Einheit (Zhang *et al.*, 2002). *Ang1* spielt eine Rolle bei der Stabilisierung von Gefäßwänden. *Ang2* ist der Antagonist zu *Ang1* (Yancopoulos *et al.*, 2000). Die Daten der Expressionsmessungen nach zerebraler Ischämie ergaben einen deutlichen Anstieg der Genexpression von *Ang2* nach 24 h. Die Expression von *Ang1* zeigte an den gemessenen Zeitpunkten keine Abweichung vom

basalen Level. Dieses Ergebnis wird von einer Arbeit von Lin et al. 2000 untermauert. Hier wurde im Rattenmodell gezeigt, dass die *Ang1* Expression erst nach einigen Tagen ansteigt. Die *Ang2* Expression hingegen steigt bereits nach 12 h signifikant an. Von Hayashi et al. wurde in einem Mausmodell beschrieben, dass die Expression von *Ang1* und *2* nach fokaler Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollen anstieg (Hayashi et al., 2003). Ob Maus- und Rattenmodell jedoch hier ähnlich reagieren, ist noch nicht untersucht worden.

Stressmarker

Die Hitze-Schock-Proteine (**Hsps**) sind ein Kennzeichen von Stressreaktionen nach diversen pathologischen Einflüssen. Sie werden nach einer Vielzahl von Erkrankungen reguliert, z.B. Epilepsie, Neurotrauma und Schlaganfall (Franklin et al., 2005). Die Überexpression von *Hsp70* beispielsweise schützt das Gehirn vor übermäßiger Schädigung (van der Weerd et al., 2005; Zheng et al., 2008). Ein Tag nach fokaler Ischämie kam es bei den eigenen Untersuchungen zu einem starken, signifikanten Anstieg der Expression. Dieser Expressionsanstieg ist auch in der Literatur zu finden (Imura et al., 1999).

C-fos und **Jun** gehören zu den ersten Stressfaktoren, die nach pathologischen Prozessen aktiviert werden. Beide Kandidaten zählen zu den *IEGs*, den Immediate Early Genes (Bialy et al., 1996; Herdegen et al., 1997). Die Expressionsmessung von *c-fos* ergab eine große Streuung der Daten in der 1,5 h Gruppe. Daher konnte kein signifikantes Ergebnis erhalten werden. Dennoch zeichnete sich eine Tendenz der Überexpression ab. Die Expression von *jun* ist nach 4 und 24 h signifikant erhöht. Nach Angaben der Literatur steigt die Expression von *jun* bis 24 h nach transienter, fokaler Ischämie stetig an und fällt im Anschluss wieder ab (Iwata et al., 1997). Die Expressionserhöhung ist laut Literatur bereits einige Minuten nach Ischämieinduktion detektierbar (An et al., 1993). Dies wurde an einem permanentem Okklusionsmodell gemessen, so dass diese Daten nur bedingt mit den eigenen vergleichbar sind. Nach transienter, fokaler Ischämie wurde im Zeitraum von 3-6 h eine Erhöhung der *c-fos* Expression gemessen (Hara et al., 2001). Dem widersprechen unsere Daten aus unbekanntem Gründen.

Der Transkriptionsfaktor **Nrf2** reguliert mehrere oxidative Stressgene (Shih et al., 2003). Die eigenen Messungen haben ergeben, dass die *Nrf2*-Expression 4 bis 24 h nach einer Ischämie signifikant ansteigt. Es gibt keine Daten in Literatur über das Expressionsverhalten von *Nrf2* nach fokaler, zerebraler Ischämie, so dass hier kein Abgleich stattfinden kann.

Nach oxidativem Stress kommen verschiedene Enzyme in der Zelle zum Einsatz, welche gegen die Superoxid-Toxizität vorgehen (z.B. **Superoxiddismutase 1** und **2**; *SOD-1 + 2*) (Culotta et al., 2006). Nach 90 min. wurde die *SOD-1* Expression als erniedrigt detektiert. Einen

Tag nach ischämischem Ereignis konnte bei *SOD-2* eine signifikante Expressionserhöhung detektiert werden. Demnach stimmte lediglich das Expressionsmuster von *SOD2* mit der Literatur überein. Nach fokaler, transientser Ischämie konnte bei beiden *SODs* eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Zeitfenster bis 24 h nach Ischämie nachgewiesen werden (Matsuda *et al.*, 2009).

Ein protektiver Mechanismus der Zelle gegen oxidativen Stress ist die Expression von **Hämoxigenase (*Hmox*)**. Ein signifikanter Anstieg der *Hmox*-Expression nach ischämischem Ereignis konnte nach 4 und 24 h nachgewiesen werden. Nach Angaben der Literatur wird die *Hmox* nach Ischämie/Reperfusionereignis hochreguliert und soll die Zelle vor postischämischem, oxidativen Stress schützen (Tsuchihashi *et al.*, 2004). Folglich stützt dies die Ergebnisse der eigenen Arbeit.

NO-Synthasen und Globine

Stickstoff-Oxid (NO) wurde erstmals 1988 als Botenstoff im Nervensystem nachgewiesen. Hier spielt es eine Rolle bei der Übertragung von Nervenimpulsen, die Calcium vermittelt sind (Garthwaite *et al.*, 1995). Die neuronale NO-Synthase (***nNOS***) produziert nach einem ischämischen Ereignis NO, was zu einer neurotoxischen Reaktion führt (Samdani *et al.*, 1997). Nach einer fokalen Ischämie konnte in der vorliegenden Arbeit nach 1,5 und 24 h ein signifikanter Anstieg der *nNOS* nachgewiesen werden. Ein Anstieg der *nNOS* Expression nach fokaler, zerebraler Ischämie wurde ebenfalls von Iadecola beschrieben (Iadecola, 1997).

1,5 h nach fokaler Ischämie konnte eine signifikante Regulation der ***iNOS*** unter den Expressionswert der nativen Tiere gemessen werden. Vier Stunden nach Ischämie war dieser Unterschied wieder verschwunden und 24 h nach induzierter Ischämie waren die Expressionslevel signifikant erhöht, im Vergleich zu den nativen Tieren. Die induzierbare NO-Synthase (***iNOS***) ist in gesundem Gewebe nicht exprimiert, sie steigt jedoch nach einem ischämischen Ereignis in seiner Expression an, ist aber erst 12 h nach einer zerebraler Ischämie die *iNOS* detektierbar (Samdani *et al.*, 1997). Da in der vorliegenden Arbeit bereits 1,5 h nach induzierter Ischämie eine Expressionsveränderung gemessen wurde, stimmen diese Daten nicht komplett mit der Literatur überein. Es muss bemerkt werden, dass die Literatur, auf die als Beleg zurückgegriffen wurde, mehr als 10 Jahre alt ist und somit die Sensitivität der Messgeräte deutlich zugenommen haben dürfte.

Der letzte Vertreter der NO-Synthasen ist die endotheliale NOS (***eNOS***). Diese NO-Synthase ist konstitutiv exprimiert (Samdani *et al.*, 1997). Wie die *iNOS*-Messung zeigte auch die *eNOS* Messung ein ähnliches Expressionsmuster mit einer erniedrigten Expressionsphase (1,5 h

nach Ischämie), einer gleich bleibenden Expression nach 4 h und einer deutlichen Expressionserhöhung 24 h nach induzierter Ischämie. Somit decken sich die gefundenen Ergebnisse mit der Literatur, in welcher beschrieben ist, dass *eNOS* nach zerebraler Ischämie hochreguliert wird.

Neuroglobin (*Ngb*) ist ein relativ junges Protein der Globinfamilie. Es wurde erstmals in neuronalem Gewebe identifiziert, wo es vermutlich den Sauerstofftransport unterstützt; vergleichbar mit dem *Myoglobin* des Muskels (Burmester *et al.*, 2000).

Nach zerebraler Ischämie wirkt *Ngb* protektiv (Greenberg *et al.*, 2008). Dies konnte vor allem an *Ngb*-überexprimierenden Mäusen gezeigt werden, welche ein deutlich geringeres Infarktvolumen aufweisen als Wild-Typ Mäusen (Khan *et al.*, 2006). 1,5 h nach zerebraler Ischämie konnte eine signifikante Expressionserhöhung von *Ngb* nachgewiesen werden. Nach 4 h ist der Expressionsunterschied nicht mehr signifikant, was jedoch mit der großen Streuung in der 4 h-Gruppe zusammenhängen kann. Erst nach 24 h konnte eine signifikante Erniedrigung der *Ngb*-Expression detektiert werden. Nach zerebraler Ischämie im Mongolischen Gerbil konnte ein Anstieg des Proteins *Ngb* im Kortex 8 h nach induzierter Ischämie nachgewiesen werden (Shang *et al.*, 2006). Ebenfalls in der Maus wurde ein erhöhtes Expressionsniveau detektiert (Sun *et al.*, 2001). Demnach belegt die Literatur bei anderen Spezies einen Anstieg der *Ngb* Expression nach fokaler Ischämie.

Cytoglobin (*Cygb*) ist ein weiterer neuer Vertreter der Globinfamilie, dessen genaue Funktion noch weitestgehend unbekannt ist. Als Mitglied der Globinfamilie ist auch *Cygb* am Sauerstofftransport beteiligt und scheint auch bei pathologischen Einflüssen eine Rolle zu spielen (Burmester *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass *Cygb* nicht signifikant nach Ischämie reguliert wird. In der 4 h Gruppe zeigte sich eine starke Streuung, die allerdings nur durch ein Tier verursacht wurde. Würde diese aus der Auswertung entfernt, wären die Expressionslevel aller Gruppen auf gleichem Niveau. In einer Arbeit über Genexpression nach globaler Ischämie konnte ebenfalls keine Veränderung der *Cygb* Expression detektiert werden (Büttner *et al.*, 2009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Messung der Ischämieproben gezeigt hat, dass die Daten der selbst designten Assays mit der Literatur weitestgehend übereinstimmen. Von den 27 durchgeführten Messungen haben 15 vollständig mit der Literatur übereingestimmt. Fünf Messungen stehen Literaturangaben entgegen und 7 Messungen konnten aufgrund fehlender Daten in der Literaturdatenbank nicht abgeglichen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass es eine Vielzahl von Ischämie modellen gibt, welche sich in ihrer Auswirkung auf die Genexpression unterschiedlich verhalten (Shimazu *et al.*, 1994). Des Weiteren gibt es

Unterschiede in der Wahl der Messmethoden und der Gehirnregion. Die vorliegenden Daten wurden nur aus dem zerebralen Kortex gewonnen, wohingegen z.B. andere Autoren die komplette Hemisphäre analysierten.

4.3.2 Die Ultraschallwirkung auf die Genexpression ist frequenzabhängig

Die Wirkung von Ultraschall auf die Genexpression im zerebralen Kortex erwies sich als frequenzabhängig. Die Regulationsfaktoren der verschiedenen Gene sind in Tabelle 4-2 gegen die unterschiedlichen Frequenzen aufgetragen.

| | | Gen | 60kHz | | 488kHz | | 3MHz | |
|----------------------------|------|--------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | | 4h | 24h | 4h | 24h | 4h | 24h |
| Apoptose-Kandidatengene | pro | <i>Tnf-a</i> | | | | | | |
| | | <i>Casp3</i> | | | -2,9 | -1,75 | | |
| | | <i>Casp9</i> | | | -1,92 | -1,47 | +1,1 | |
| | | <i>AiF</i> | | | | | +1,2 | |
| | anti | <i>bcl-2</i> | | | | +1,56 | | +1,87 |
| | | <i>Akt1</i> | | | -2,2 | | | |
| | | <i>Akt2</i> | | | -2,88 | -2,28 | | |
| | | <i>Akt3</i> | | | | | +2,61 | |
| Angiogenese-Kandidatengene | | <i>Vegfa</i> | | | -1,8 | | | |
| | | <i>Egr1</i> | | | -4,15 | -2,75 | | |
| | | <i>EfnA5</i> | | | -3,16 | | -2,66 | |
| | | <i>Egfr</i> | | | -2,54 | | -2,31 | |
| | | <i>Ang1</i> | | | -2,16 | | | |
| | | <i>Ang2</i> | | | | | | |
| Stress-marker | | <i>hsp27</i> | | | | | | |
| | | <i>hsp70</i> | | | | | | |
| | | <i>C-fos</i> | | | | | | |
| | | <i>Jun</i> | | | | | | |
| | | <i>Nrf-2</i> | | | | | | |
| Globine / NOS | | <i>Cygb</i> | | | | +1,61 | +1,51 | +1,53 |
| | | <i>Ngb</i> | | | | | | |
| | | <i>nNOS</i> | | +2,58 | | +2,32 | | +2,65 |
| | | <i>eNOS</i> | | | | | | |
| | | <i>iNOS</i> | | | | | | |

Tabelle 4-2: Differentielle Genregulation nach verschiedenen Ultraschallbehandlungen

Aus gezeigter Abbildung wird ersichtlich, dass nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung am wenigsten Genregulationen detektiert werden konnten (1 von 24). Die leeren Felder zeigen an, dass keine signifikante Regulation gemessen wurde. Nach einer Behandlung mit 488 kHz Ultraschall waren immerhin 16 von 24 Genen reguliert vorgefunden worden. Die Gesamtmenge der Gene betrug hier 24, da die oxidativen Stressgene nicht gemessen wurden. Die Behandlung mit 3 MHz Ultraschall hatte immerhin noch die Regulation von 9 Genen zur Folge.

Die Tabelle zeigt, dass die verschiedenen Ultraschallfrequenzen unterschiedliche Expressionsmuster induzieren. Am geringsten scheinen die Einflüsse der 60 kHz Sonde zu sein, da hier lediglich ein Gen in seiner Expression verändert vorgefunden wurde. Dem schließt sich die diagnostische 3 MHz-Duplex Sonde an, unter deren Einfluss sich 9 Gene als reguliert zeigten. Die meisten Änderungen der Genexpression waren nach Anwendung der 488 kHz Sonde zu verzeichnen: 16 Gene von 24 wurden hiernach differentiell reguliert. Die Verteilung der Regulationen auf die gemessenen Genklassen wird nun im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3.2.1 Wirkung von Ultraschall auf die Apoptose – teilweise ähnliche Muster wie nach einer Ischämie

Ebenso wie nach fokaler Ischämie zeigt auch nach den verschiedenen Ultraschallbehandlungen *TNF- α* keine Veränderung seiner Genexpression. Demnach scheint weder Ischämie noch Ultraschall eine Wirkung auf dessen Expression zu haben.

Eine Ultraschallbehandlung mit 488 kHz hatte an beiden gemessenen Zeitpunkten (4 h und 24 h) eine signifikante Erniedrigung der *Caspase 3* Expression zur Folge. Caspase 3 spielt eine essentielle Rolle bei der apoptotischen Chromatin Kondensation und DNA Fragmentierung (Porter *et al.*, 1999). Demzufolge würde eine verringerte Expression sich protektiv auf eine ischämische Läsion auswirken. Dies passt zu dem Befund von Saguchi *et al.* wonach eine Behandlung mit 488 kHz Ultraschall keine pathologischen Veränderungen hervorruft (Saguchi *et al.*, 2008). Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass die 488 kHz Behandlung möglicherweise anti-apoptotisch wirkt (siehe Abb. 4-1).

Ähnlich wie bei *Caspase 3* konnte auch bei *caspase 9* nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung nach 4 und 24 h eine signifikante Erniedrigung der Expression detektiert werden. Dies ist nicht verwunderlich, da die beiden *Caspasen* im Apoptose Weg eng miteinander verknüpft sind und *caspase-3* die *caspase-9* reguliert. Demnach folgt der beschriebenen Herunterregulation von *caspase-3* auch eine niedrigere *caspase-9* Expression. Vergleicht man nun diese Daten mit den Daten der fokalen Ischämie, so kann man feststellen, dass in beiden Fällen *caspase-9* herunter reguliert wird. Lediglich das Zeitfenster ist verschoben, da die Regulation 1,5 bis 4 h nach einem ischämischen Ereignis und 4 bis 24 h nach einer Ultraschallbehandlung gemessen wurde. Dies ist ein weiterer Beleg für die mögliche, protektive Wirkung einer 488 kHz Ultraschallbehandlung. In folgenden Studien ist zu diskutieren, ob eine Prä- oder Postkonditionierung mit Ultraschall möglich ist (Bernaudin *et al.*, 2002; Pignataro *et al.*, 2009; Stenzel-Poore *et al.*, 2007).

Vier Stunden nach einer 3 MHz Ultraschallbehandlung wurde eine Hochregulation der *Caspase 9* Expression gemessen. Dies könnte der Expressionerniedrigung nach einer Ischämie entgegenwirken und sich somit therapeutisch als kontraproduktiv erweisen. Da jedoch nur punktuell 4 h nach einer Behandlung eine solche Expressionserhöhung nachgewiesen werden konnte, bleibt offen, ob dies eine signifikante Auswirkung auf den Ablauf der Apoptose hätte.

Ebenfalls 4 h nach einer 3 MHz Ultraschallbehandlung konnte eine signifikante Änderung des *AiF*-Expressionsniveaus beobachtet werden. Diesmal jedoch wirkte sich die Behandlung expressionssteigernd aus. Verschiedene Studien konnte belegen, dass die Expressionerniedrigung von *AiF* einen neuroprotektiven Effekt hat (Cao *et al.*, 2007; Lorenzo *et al.*, 1999). Demnach würde sich eine durch Ultraschall induzierte Expressionssteigerung negativ auf die ischämische Läsion auswirken.

Bcl2 verhindert die Aktivierung der Procaspasen (Newmeyer *et al.*, 2000) und kann somit neuroprotektiv nach einem ischämischen Ereignis wirken (Cao *et al.*, 2002). Ein Tag nach einer 488 kHz und 3 MHz Ultraschallbehandlung ist die Expression von *bcl2* signifikant erhöht. Vergleichend hierzu wurde eine Expressionserhöhung im Anschluss an eine Ischämie nach 1,5 h detektiert. Dies könnte eine Regulation des Organismus auf die bevorstehenden Schäden sein, welche jedoch zu diesem Zeitpunkt keine Auswirkung auf die Läsionsentwicklung haben muss. Allerdings 24 h nach einer Ischämie könnte sich die erhöhte Expression von *bcl2* nach einer Ultraschallbehandlung als protektiv herausstellen.

Den Genen *akt1-3* wird eine entscheidend Rolle für das Überleben von neuronalen Zellen zugeschrieben (Dudek *et al.*, 1997). Vier Stunden nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung wurde eine Erniedrigung der Genexpression von *akt1* detektiert. Die anderen Sonden zeigten keine regulatorischen Wirkungen. Nach einem ischämischen Ereignis konnten unsere Arbeiten eine erhöhte Expression von *akt1* an den Zeitpunkten 4 und 24 h nachweisen. Da lediglich 4 h nach einer Ultraschallbehandlung eine Expressionerniedrigung gemessen werden konnte, würde dies nach einer Ischämie wahrscheinlich nicht zu einer Verschlechterung des Ergebnisses führen, da die meisten Apoptoseprozesse erst nach einem oder mehreren Tagen wirksam werden.

Die Behandlung mit 488 kHz Ultraschall hatte eine gesteigerte Expression des *akt2* Gens zur Folge, jedoch hier an beiden gemessenen Zeitpunkten. Bisläng ist nur wenig über die Funktion der verschiedenen Isoformen von *akt* bekannt. Das Fehlen der Isoformen 2 und 3 hatte keinen lethalen Phänotyp zur Folge (Dummler *et al.*, 2006; Dummler *et al.*, 2007), jedoch lässt dies nichts auf deren Funktion nach einer zerebralen Ischämie schließen.

24 h nach Behandlung mit der 3 MHz Sonde konnte eine gesteigerte Expression des *akt3* Gens gemessen werden. Versuche an *akt3*-knock-out Mäusen haben ergeben, dass sich in der

Entwicklung die Organgröße ändert. Die Organe fallen bei den knock-out Tieren alle kleiner aus als bei dem Wildtyp (Easton *et al.*, 2005). Demnach kann vermutet werden, dass die gesteigerte Expression von *akt3* nach Behandlung mit 3 MHz Ultraschall sich nicht negativ auf das Gewebe im Anschluss an eine zerebrale Ischämie auswirken würde.

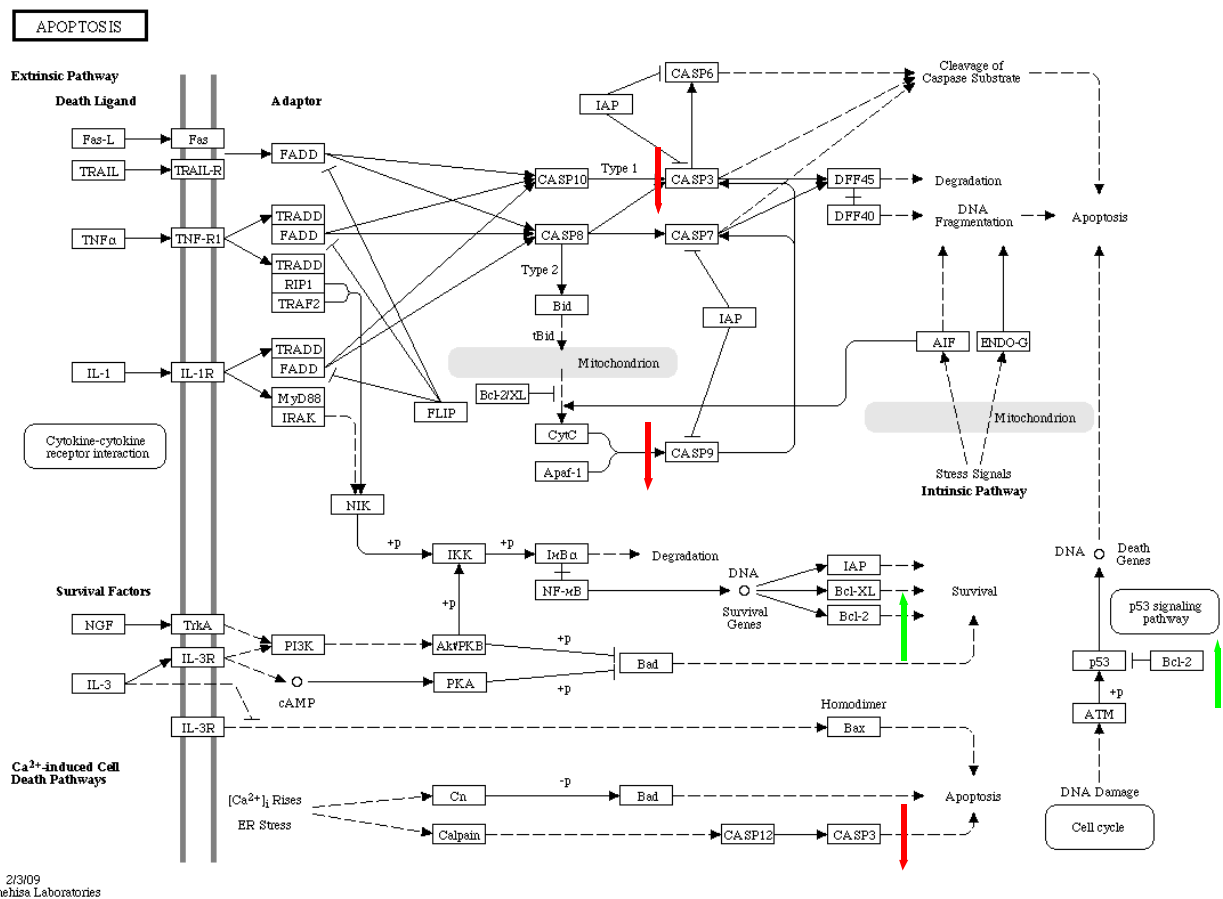


Abbildung 4-1: Der Apoptosesignalweg und gemessene Veränderungen der Genexpression nach Anwendung der 488 kHz Sonde

In obiger Abbildung sind die detektierten Regulationen der 488 kHz Sonde eingetragen. Demnach könnte sich eine Behandlung mit 488 kHz Ultraschall protektiv auswirken, da die getesteten pro-apoptotische Marker (*Caspase 3 und 9*) runter (rote Pfeile) und ein anti-apoptotischer Marker (*bcl2*) hochreguliert (grüne Pfeile) vorgefunden wurde. Bei der Behandlung mit 3 MHz Ultraschall wurde lediglich die Expression des Gens *bcl2* erhöht detektiert (grüne Pfeile). (Diagramm modifiziert nach http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/show_pathway?map04210)

4.3.2.2 488 kHz Ultraschall zur Stärkung der Angiogenese?!

Lediglich 4 h nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung konnte eine Erniedrigung des *VEGF* Expressionslevels identifiziert werden. Dies könnte sich protektiv auf eine ischämische

Läsion auswirken, da wie bereits beschrieben die frühe Applikation von *VEGF* zu schädlichen Prozessen führt (Zhang *et al.*, 2000).

Egr1 wurde 4 h und 24 h nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung als signifikant erniedrigt detektiert. Experimente mit *Egr1*-knock-out Mäusen konnten zeigen, dass nach dem Ausschalten von *Egr1* die Läsion kleiner ausfällt (Tureyen *et al.*, 2008). Demnach könnte eine Subpression der *Egr1* Expression zu einem verbesserten neurologischen Outcome führen.

4 h nach einer Behandlung mit 488 kHz und 3 MHz Ultraschall wurde ebenfalls wie nach fokaler Ischämie eine Erniedrigung der *Ephrin (EFNA-5)*-Expression gemessen. Ephrin-5 ist ein Wachstumsinhibitor (Carmichael *et al.*, 2005). Demnach könnte eine Expressionserniedrigung sich positiv auf regenerierendes Gewebe auswirken.

Die Behandlung mit 488 kHz und 3 MHz Ultraschall hatte zur Folge, dass das Expressionsniveau von *Egfr* nach 4 h signifikant runter reguliert wurde. Folglich sollte die Behandlung mit den Sonden 488 kHz und 3 MHz sich negativ auf die ischämische Läsion auswirken, da eine gesteigerte Expression von *Egfr* sich als protektiv herausgestellt hatte (Justicia *et al.*, 1999).

Vier Stunden nach einer 488 kHz Ultraschallbehandlung konnte eine Verminderung der *Ang1* Expression detektiert werden. Diese Erniedrigung könnte eine Schwächung der Blut-Hirnschranke zur Folge haben, was bereits durch andere Techniken im Anschluss an Ultraschallbehandlungen belegt wurde (Hynynen, 2008; McDannold *et al.*, 2008; Patrick *et al.*, 1990). Dies könnte in der Akutphase eines Schlaganfalls genutzt werden, um neuroprotektive Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke zu schleusen.

Letztlich scheint die Behandlung mit 488 kHz Ultraschall sich insgesamt positiv auf die Entwicklung der Angiogenese auszuwirken.

4.3.2.3 Auch 60 kHz Ultraschall verursacht keine Stressreaktion

Die Expression der Hitze-Schock-Proteine (*Hsps*) ist ein Kennzeichen von Stressreaktionen nach diversen pathologischen Einflüssen. Jedoch war keine Expressionsänderung nach einer Ultraschallbehandlung messbar gewesen. 24 h nach einer 60 kHz Ultraschallbehandlung konnte eine Tendenz der Expressionssteigerung detektiert werden, die allerdings nicht signifikant war. Demnach scheint Ultraschall keine pathologische Reaktion der *hsps* zu induzieren. Indirekte Hinweise auf z.B. pathologisch-thermische Nebenwirkung im Kortex finden sich somit nicht.

Die Ultraschallbehandlungen ergaben, wie schon im Falle der *Hsps*, keine Expressionsveränderung der gemessenen IEGs *Jun* und *C-fos*. Da *C-fos* sich bereits sehr schnell

nach einem pathologischen Ereignis in seiner Expression verändert, wurde nur exemplarisch eine Messung der 60 kHz Proben nach 4 h durchgeführt (An *et al.* 1993). Hier kam es zu einer starken Streuung in der Expression, die durch ein Tier verursacht wurde. Würde dieses Tier aus der Messung herausgenommen, wären die Expressionslevel der unterschiedlichen Gruppen auf gleichem Niveau. Demnach hat Ultraschall keinen Einfluss auf die Expression von *IEG*-Stressfaktoren im gesunden Gehirn. Interessant ist, dass die Einstellung der 60 kHz Sonde im ischämischen Gehirn zu einer signifikanten Schädigung der Penumbra führt, jedoch im nativen Gehirn keine Stressreaktion im Kortex auslöst. Die Untersuchung weiterer Hirnregionen könnten Aufschluss darüber geben, ob dieses Phänomen zwischen den einzelnen Gehirnregionen variiert.

4.3.2.4 Neuronale NOS (*nNOS*) wird nach allen Ultraschallbehandlungen hochreguliert

Vierundzwanzig Stunden nach allen Ultraschallbehandlungen (60 kHz, 488 kHz und 3 MHz) wurde ein signifikanter Anstieg der Genexpression von *nNOS* gemessen. Der Anstieg der Genexpression nach Ultraschallbehandlung könnte ein erster Hinweis auf einen schädigenden Mechanismus der Behandlung sein. Insbesondere, da die Expressionserhöhung nach allen Ultraschallbehandlungen (ca. 2,5-fach) vergleichbar ist mit der Erhöhung nach einer fokalen Ischämie.

Nach den verschiedenen Ultraschallbehandlungen war keine Regulation der *iNOS* Expression detektierbar. Mit den erhobenen Daten muss der These, dass *iNOS* in gesundem Gewebe nicht detektierbar ist, widersprochen werden. Dies kann daran liegen, dass mittlerweile die Untersuchungsmethoden sensitiver geworden sind. Die Literatur, auf die sich bezogen wurde, stammt aus dem Jahr 1997 (Samdani *et al.*, 1997). Die absolute Kopienzahl von *iNOS* bewegte sich in nativem Gewebe um den Wert 270 Kopien. Das Expressionsniveau im Vergleich zu anderen Genen ist demnach verhältnismäßig niedrig.

Die Gewebe, welche mit Ultraschall behandelt worden waren, zeigten keine signifikante Expressionsänderung der *eNOS*.

4.3.2.5 *Kein oxidativer Stress durch Ultraschall – aber was ist mit den Globinen?!*

Da der Transkriptionsfaktor *Nrf2* nicht reguliert vorgefunden wurde, waren exemplarisch lediglich die Proben der 60 kHz Sonde auf die Expression der verschiedenen Sauerstoffstressgene (*SODs*, *Hmox*) untersucht worden. Da sich hierbei keine Veränderungen zeigten und ebenfalls *Nrf2* bei den Sonden 488 kHz und 3 MHz nicht als reguliert detektiert worden war, wurden die Sauerstoffstressgene bei den Proben der 488 kHz und 3 MHz Sonde nicht gemessen.

Würden oxidative Stressprozesse nach einer Ultraschallbehandlung ablaufen, wäre ein Anstieg der *SODs* und *Hmox* zu erwarten gewesen. Daher wurde zunächst ausschließlich das Gewebe der 60 kHz Sonde getestet, da hier am ehesten solche Reaktionen vermutet wurden (Kuttruff, 1988). Die anderen Sonden wurden nicht getestet, da hier bereits *in vivo* keine schädlichen Effekte nachgewiesen wurden.

Im Gegensatz zu den Ischämieproben fanden sich bei der Messung der Ultraschallproben keine Expressionsänderungen *Ngb* betreffend.

Nach Behandlungen mit 488 kHz und 3 MHz zeigte sich eine Regulation des *Cygb*. *Cytoglobin* ist mit *nNOS* unter Umständen funktionell assoziiert. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob *Cygb* Sauerstoff für die NO-Synthase bereitstellt oder NO detoxifiziert, indem es als Dioxygenase wirkt (Burmester *et al.*, 2007). In Tabelle 4-2 sind alle Genregulationen der Ultraschallsonden miteinander vergleichend aufgetragen. Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass nach allen Ultraschallbehandlungen die Expression von *nNOS* hochreguliert wird und zumindest bei den Sonden 488 kHz und 3 MHz *Cygb* gleichzeitig hochreguliert ist. Hätte *Cygb* eine detoxifizierende Wirkung auf NO, könnte dies ein Indiz für die schädliche Wirkung von 60 kHz Ultraschall sein, da hier keine Heraufregulation des detoxifizierenden *Cygb* stattfindet.

4.3.2.6 *Zusammenfassung und Ausblick*

Die vorliegende Studie konnte zum ersten Mal zeigen, dass im Gehirn eine Vielzahl von Genen nach einer Ultraschallbehandlung in ihrer Expression verändert sind. Vor allem war es überraschend, dass die 60 kHz Ultraschallsonde die wenigsten Regulationen aufzeigte (Tabelle 4-2), obwohl hier nach bisherigen Studien die größten zellulären Schäden beobachtet werden konnten. Demnach scheint die Anzahl differenziell regulierter Gene kein direktes Indiz für die schädliche Wirkung des Ultraschalls zu sein. Vielmehr kann diskutiert werden, dass die Regulationen seitens der 488 kHz Sonde protektive Prozesse in Gang setzen, welche die Ischämie zumindest nicht negativ beeinflussen. Ein Beleg hierfür könnte eine Studie erbringen,

bei welcher Tiere wenige Stunden vor einer Ischämieinduktion mit Ultraschall behandelt würden (Präkonditionierung). In einer weiteren Gruppe könnte die Postkonditionierung getestet werden, indem einige Zeit nach einer Ischämieinduktion Tiere beschallt werden, um anschließend die Genexpression zu messen und Zellschäden zu untersuchen. Die in meiner Arbeit gezeigten Daten beziehen sich zudem stets auf gesunde Tiere ohne ischämische Schädigung. Daher wäre eine Untersuchung der Genexpression nach kombinierter Ischämie/Ultraschallbehandlung sinnvoll.

Des Weiteren wäre der Zusammenhang der Ergebnisse zwischen *nNOS*-Expression und *Cygb* interessant. Versuche an knock-out Mäusen könnten Aufschluss darüber geben, ob *Cygb* bei Überexpression nach einer Ultraschallbehandlung protektiv wirkt oder nicht.

Einschränkend muss gesagt werden, dass die erhobenen Daten lediglich die Expressionslevel des zerebralen Kortex anzeigen, welcher dem Ultraschall räumlich gesehen als erstes exponiert war. Die Untersuchung anderer Regionen wie Hippocampus oder Basalganglien könnte weitere, wertvolle Hinweise auf die Ultraschallwirkung im Hirngewebe liefern. Möglicherweise kommt es an der Schädelbasis zur Überlagerung von Ultraschallwellen, da hier der Schall reflektiert werden könnte. Dies könnte sich auch auf das Niveau der Genexpression niederschlagen. Ein erstes Indiz für einen solchen Effekt konnte in der ersten 60 kHz Ultraschallstudie erbracht werden, da hier an der basalen Seite des Gehirns intrakranielle Blutungen lokalisiert werden konnten (Nedelmann *et al.* 2008a).

Zusätzlich sollten zu den Genexpressionsdaten auch Proteinexpressionsdaten erhoben werden, da die Erhebung der Genexpression nur ein – wenn auch oft valider - Indiz für die Translation der Gentranskripte ist. Regulationen auf Ebene der Translation, verursacht durch Ultraschall, könnte die gemessenen Effekte aufheben oder gar verstärken. Weitere protektive Hinweise geben andere Studien, welche die Wirkung von Ultraschall auf kultivierte Knochenzellen untersuchten. Hier konnten positive Effekte auf die Proliferation dieser Zellen nachgewiesen werden (Tang *et al.* 2007).

4.4 Mikroarrays im Vergleich

Die eigene Durchführung von Mikroarray-Experimenten führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Die Resultate waren sehr schlecht, was nicht primär an den verwendeten Methoden, sondern vielmehr an der ungenügenden Qualität der verwendeten kommerziellen Slides gelegen hat. Dies wird dadurch bestärkt, dass die Firma Operon diese Arrays mittlerweile vom Markt genommen hat. Daher wurde im Laufe der Studie ein Versuch mit Affymetrix-Chips unternommen. Da die Ergebnisse jedoch aus Kostengründen nur von einer Probe plus Kontrolle stammten, sind diese statistisch nicht valide. Die Proben, welche zur Hybridisierung der Arrays verwendet worden waren, wurden zuvor in mehreren qPCR Läufen als stabilste Proben ermittelt, welche meist den Mittelwert der Gruppe repräsentierten.

4.4.1 Der Affymetrix-Chip zeigt nur geringe, differentielle Genregulationen

4 h nach der Ultraschallbehandlung wurden nur etwa 100 von mehr als 22.000 Genen als reguliert detektiert. Von diesen Genen waren die meisten lediglich als anonymer Genlokus in der Datenbank beschrieben. Die funktionell annotierten Gene ließen sich in vier Gruppen untergliedern, die den Transkriptionsfaktoren, membran-assoziierten Proteinen, Apoptose-Proteinen und Stoffwechsel-Enzymen zuzuordnen waren. Interessant ist hier die Gruppe der membran-assoziierten Proteine, da in verschiedenen Publikationen bereits eine Blut-Hirn-Schrankenstörung durch Ultraschall beschrieben wurde (Hynynen, 2008; McDannold *et al.*, 2008). Die Erklärung hierfür könnte die Beeinflussung von membran-assoziierten Proteinen sein, welche die Membran durchgängig für verschiedene Stoffe machen. Transkriptionsfaktoren können verschiedene Funktionen im Organismus ausführen. Diese Genklasse müsste daher in Zusammenhang mit deren Zielgenen analysiert werden. Eine weitere sehr interessante Gruppe ist die der Apoptosegene, da möglicherweise Ultraschall den programmierten Zelltod induziert.

24 h nach einer Behandlung mit Ultraschall kam es schon zu deutlich mehr Regulationen. Es wurden etwa 200 Gene von 22.000 als differentiell reguliert gemessen. Die Eingruppierung der Gene in Kategorien ähnelte derjenigen der 4 h Gruppe, jedoch kamen hier wichtige Kategorien wie „Angiogenese“, „Stress Marker“ und „G-Protein-assoziierte Gene“ hinzu. Hier wird die Gruppe der Apoptosemarker interessanter. 24 h nach einer Behandlung könnte die Regulation von Apoptosemarkern deutlich stärkeren Einfluss auf die Entwicklung einer ischämischen Läsion haben, als 4 h nach einer Behandlung. Ebenfalls interessant ist die hinzugekommene Gruppe der G-Protein-assoziierten Gene, da diese in direkten Zusammenhang mit den membran-

assoziierten Proteinen gebracht werden kann. Demnach sollte der Untersuchung von Membranschäden nach einer Ultraschallbehandlung mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Vorausblickend sollten weitere Array-Studien durchgeführt werden, jedoch mit mehreren Proben als Grundlage, um eine statistische Relevanz der Ergebnisse zu erzielen. Dies könnte die gewonnenen Ergebnisse belegen und das Wissen über die Wirkung von Ultraschall auf Hirngewebe vertiefen.

4.4.2 Daten von Mikroarrays und qPCR sind nicht vergleichbar

Der Vergleich der Daten der Mikroarrays und qPCR erbrachte lediglich eine Übereinstimmung das Gen *Igfbp* betreffend. Jedoch stimmt lediglich die Regulationstendenz überein und es ist nicht von einer exakten Übereinstimmung zu sprechen. Alle anderen Gene zeigten keine Übereinstimmung zwischen den Methoden (siehe Tabelle 4-3).

| Gen | Microarray | | QPCR-Versuche | | | | | | | | |
|-----------------|------------|------|---------------|-------|--------|-----|------|-----|----------|-------|-------|
| | 60kHz | | 60kHz | | 488kHz | | 2MHz | | Ischämie | | |
| | 4h | 24h | 4h | 24h | 4h | 24h | 4h | 24h | 4h | 24h | |
| <i>Igf2</i> | | -2,3 | | | | | | | | | |
| <i>Igf2-UTR</i> | | -2,3 | -1,62 | | | | | | | -1,75 | |
| <i>Igfbp</i> | | -2,0 | | -1,58 | | | | | | | |
| <i>Il6ra</i> | +2,2 | | | | | | | | | | +2,35 |
| <i>junD</i> | -18,38 | +3,0 | | | | | | | | | -2,5 |

Tabelle 4-3: Übersicht Vergleich Mikroarray und qPCR-Daten der selektierten Kandidatengene

Es ist lediglich eine Übereinstimmung zu finden (*Igfbp*).

Abschließend kann gesagt werden, dass der Vergleich der Daten lediglich einen ersten Versuch darstellte, da nach der Messung von nur einem Array-Experiment nicht von einer echten statistischen Signifikanz ausgegangen werden kann. Des Weiteren fiel bei den Messungen der Referenzgene ein immer wiederkehrendes Expressionsmuster auf, welches mit dem Alter der Proben in Zusammenhang gebracht werden kann. Demnach zeigen die „älteren“ Proben ein deutlich geringeres Expressionsniveau als die „neueren“ Proben. Es wurde bereits in einer Publikation beschrieben, dass die Qualität der RNA entscheidend für die Ergebnisse der qPCR Messung sind (Fleige *et al.*, 2006). Daher ist bei dem Entwurf von Genexpressionsstudien darauf zu achten, nicht zu viel Zeit zwischen Gewebegewinnung und Messung verstreichen zu lassen.

5 Zusammenfassung

In den westlichen Ländern nimmt die Zahl der Schlaganfall-Patienten stetig zu und zählt mittlerweile zu einer der häufigsten Todesursachen. Derzeit ist die Rekanalisationstherapie mit dem Fibrinolytikum rt-PA die einzig zugelassene Therapie. Die Rekanalisationsrate ist oftmals inkomplett und aufgrund von möglichen Blutungskomplikationen die Therapie nicht bei allen Patienten möglich. Daher ist es wichtig, Alternativtherapieansätze (z.B. Ultraschallthrombolysen) zu entwickeln. Blutgerinnsel können mit Hilfe von Ultraschall in Schwingung gebracht und so lysiert oder die Wirkung von rt-PA verstärkt werden. Die vorliegende Arbeit hatte die Evaluation von Bioeffekten von 60 kHz Ultraschall an gesundem und ischämischem Hirngewebe zum Ziel. Neben tierexperimentellen Methoden kamen auch molekular-biologische Techniken zur Anwendung. Die erste Studie beschäftigte sich mit der Wirkung von 60 kHz (Intensität: 0,2 W/cm² und Duty Cycle 50%) auf ischämisches Hirngewebe (permanent ischämisch und nach Reperfusion). Lediglich nach Reperfusion und Ultraschallbehandlung war das Läsionsvolumen signifikant erhöht, so dass von einer besonderen Vulnerabilität des Hirngewebes nach Reperfusion auszugehen ist (Penumbraschädigung). In der neurologischen Beurteilung der Tiere zeigte sich bei allen Tieren mit permanenter Okklusion und etwa einem Drittel der Tiere nach Reperfusion und Ultraschallbehandlung eine Hörminderung. In der anschließenden Studie wurde die Ultraschallintensität erniedrigt und der Duty Cycle variiert. In einer publizierten *in vitro* Studie konnte die zunehmende Lyserate mit steigendem Duty Cycle nachgewiesen werden. Die Auswertung ergab eine Abhängigkeit des Läsionsvolumens von der Länge des Duty Cycles. Der dritte Teil der Arbeit befasst sich mit der Wirkung von Ultraschall auf die Genexpression. Hierzu wurden gesunde Ratten mit Ultraschall verschiedener Frequenzen (60 kHz, 488 kHz und 3 MHz) transkranial behandelt und 4 h bzw. 24 h nach der Behandlung getötet. Proben von ischämischen Tieren dienten als positive Kontrollen. Aufgrund von Literaturrecherchen wurden mehrere Kandidatengene ermittelt. Die Messung der Ischämieproben ergab eine weitgehende Übereinstimmung mit der Literatur. Die Messungen an den mit 60 kHz behandelten Proben ergaben kaum Anzeichen für eine differenzielle Genregulation. Die Frequenz von 488 kHz zeigte die meisten Regulationen, gefolgt von der Behandlung mit 3 MHz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei den detektierten Veränderungen um protektive Mechanismen handelt, da diese Frequenzen bislang im Tierversuch als nebenwirkungsarm beschrieben wurden. Die Auswertung von 60 kHz-Proben mit Affymetrix Arrays ergab lediglich einige wenige differentiell regulierte Gene. Die Array-Experimente konnten nicht durch qPCR-Messungen bestätigt werden.

6 Summary

On a list of the most causes of death, stroke is at the third place in the industrial nations. Therefore stroke research gets a more and more important role. At present the only permitted therapy is the lysis with rtPA. Unfortunately the lysis rate is often incomplete and the application is attended with a high bleeding rate. This is but one reason why it is so important to develop new therapies like ultrasound thrombolysis. The structure of blood clots can be slacked by ultrasound. This could enlarge the surface where lysis agents like rtPA can take effect. The present thesis was designed to evaluate bioeffects of ultrasound on healthy and ischemic tissue. Experimental animal models and molecular genetic methods were used to investigate these effects. The first study was aimed to evaluate the effect of 60 kHz ultrasound (intensity 0,2 W/cm² and duty cycle 50%) on ischemic tissue in a permanent and reperfusion suture model. Lesion volume was significantly after reperfusion and ultrasound treatment. We draw the conclusion that it results in the higher vulnerability of the ischemic penumbra. The neurological testing showed that all animals in the permanent occluded group and a third of the reperfusion group had a hearing disability. In the following study the intensity of ultrasound and the duty cycle were changed. A published *in vitro* study showed that lysis rate can be increased with higher duty cycles. The analysis detected a connection of the length of duty cycle and increased ischemic lesion at short duty cycles (20%). The third part of the thesis covers experiments to investigate the effect of ultrasound on gene expression. For this purpose healthy rats were transcranially subjected to different frequencies of ultrasound (60, 488 kHz and 3 MHz) and sacrificed 4 or 24 hours after the treatment. Ischemic samples were collected to have positive controls. For all ultrasound probes there existed literature of *in vivo* studies. 488 kHz and 3 MHz ultrasound caused no harmful effects after treatment compared to the detrimental effects of the 60 kHz ultrasound probe. With the help of the literature a few candidate genes were selected. The measurements of the 60 kHz samples showed nearly no significant expression changes but there were a few after 488 kHz and 3 MHz insonation. It seems that the monitored expression changes describe protective mechanism that probably could inhibit cerebral damage after an ischemic insult. Additionally some samples of the 60 kHz animals were selected and microarray experiments. There were only a few differential expressed genes detected. In a next step they were tested in all experimental groups with qPCR. The results could not be confirmed.

7 Literaturverzeichnis

Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA et al. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tpa infusion when continuously monitored with 2-mhz transcranial doppler monitoring. *Stroke* (2000) 31: pp. 610-614.

Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC et al. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* (2004) 351: pp. 2170-2178.

An G, Lin TN, Liu JS et al. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* (1993) 33: pp. 457-464.

Arvin B, Neville LF, Barone FC et al. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* (1996) 20: pp. 445-452.

Atar S, Luo H, Nagai T et al. Arterial thrombus dissolution in vivo using a transducer-tipped, high-frequency ultrasound catheter and local low-dose urokinase delivery. *J. Endovasc. Ther.* (2001) 8: pp. 282-290.

Back T, Kohno K, Hossmann KA Cortical negative dc deflections following middle cerebral artery occlusion and kcl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1994) 14: pp. 12-19.

Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E et al. Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J. Neurosci.* (1994) 14: pp. 846-856.

Bao S, Thrall BD, Miller DL Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* (1997) 23: pp. 953-959.

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM et al. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* (1986) 17: pp. 1304-1308.

Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D et al. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound Med Biol* (1999) 25: pp. 269-273.

Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M et al. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* (2001) 27: pp. 1683-1689.

Belayev L, Alonso OF, Busto R et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* (1996) 27: p. 1616-22; discussion 1623.

- Bernaudin M, Nedelec A, Divoux D et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and vegf, in the adult mouse brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2002) 22: pp. 393-403.
- Bernstine RL, Litt BD Ultrasonic doppler studies of the heart in the foetal guinea pig. *Ultrasonics* (1969) 7: pp. 127-128.
- Biały M, Kaczmarek L C-fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* (1996) 56: pp. 567-577.
- Biervert C, Horvath E, Fahrig T Semiquantitative expression analysis of ephrine-receptor tyrosine kinase mrna's in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* (2001) 315: pp. 25-28.
- Birnboim HC, Doly J A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res.* (1979) 7: pp. 1513-1523.
- Block F, Schwarz M [neuroprotection in stroke. a critical overview]. *Nervenarzt* (1999) 70: pp. 101-110.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* (2008) 62: pp. 302-309.
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S et al. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* (2000) 407: pp. 520-523.
- Burmester T, Gerlach F, Hankeln T Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2007) 618: pp. 169-180.
- Büttner F, Cordes C, Gerlach F et al. Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain Res.* (2009) 1252: pp. 1-14.
- Cao Y, Shibata T, Rainov NG Liposome-mediated transfer of the bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischemia in an animal model. *Gene Ther.* (2002) 9: pp. 415-419.
- Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AKF, Gao Y, Yin X, Clark RSB, Graham SH, Chen J Critical role of calpain i in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci.* (2007) 27: pp. 9278-9293.
- Cao G, Xing J, Xiao X et al. Critical role of calpain i in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci.* (2007) 27: pp. 9278-9293.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K et al. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* (2001) 32: pp. 2426-2432.

- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J Li S* Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp. Neurol.* (2005) 193: pp. 291-311.
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L et al.* Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp. Neurol.* (2005) 193: pp. 291-311.
- Chang Y, Hsiao G, Chen S et al.* Tetramethylpyrazine suppresses hif-1alpha, tnf-alpha, and activated caspase-3 expression in middle cerebral artery occlusion-induced brain ischemia in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* (2007) 28: pp. 327-333.
- Church CC Miller MW* Quantification of risk from fetal exposure to diagnostic ultrasound. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (2007) 93: pp. 331-353.
- Colli BO, Tirapelli DPDC, Carlotti CGJ et al.* Biochemical evaluation of focal non-reperfusion cerebral ischemia by middle cerebral artery occlusion in rats. *Arq Neuropsiquiatr* (2008) 66: pp. 725-730.
- Culotta VC, Yang M O'Halloran TV* Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta* (2006) 1763: pp. 747-758.
- Dabney AR Storey JD* A reanalysis of a published affymetrix genechip control dataset. *Genome Biol.* (2006) 7: p. 401.
- Daffertshofer M, Huang Z, Fatar M et al.* Efficacy of sonothrombolysis in a rat model of embolic ischemic stroke. *Neurosci. Lett.* (2004) 361: pp. 115-119.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P et al.* Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: results of a phase ii clinical trial. *Stroke* (2005) 36: pp. 1441-1446.
- Dalkara T Moskowitz MA* Neurotoxic and neuroprotective roles of nitric oxide in cerebral ischaemia. *Int. Rev. Neurobiol.* (1997) 40: pp. 319-336.
- Dinarello CA* The biology of interleukin-1. *Chem. Immunol.* (1992) 51: pp. 1-32.
- Dirnagl U, Iadecola C Moskowitz MA* Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* (1999) 22: pp. 391-397.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M et al.* Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann. Neurol.* (2008) 63: pp. 720-728.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF et al.* Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase akt. *Science* (1997) 275: pp. 661-665.

- Dummler B, Tschopp O, Hynx D et al.* Life with a single isoform of akt: mice lacking akt2 and akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26: pp. 8042-8051.
- Dummler B, Hemmings BA* Physiological roles of pkb/akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* (2007) 35: pp. 231-235.
- Easton RM, Cho H, Roovers K et al.* Role for akt3/protein kinase bgamma in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* (2005) 25: pp. 1869-1878.
- Eggers J, König IR, Koch B et al.* Sonothrombolysis with transcranial color-coded sonography and recombinant tissue-type plasminogen activator in acute middle cerebral artery main stem occlusion: results from a randomized study. *Stroke* (2008) 39: pp. 1470-1475.
- Andrej Fabrizius* Molekulare auswirkungen von ultraschallbehandlung auf die genexpression im säugerhirn. (2009) : .
- Fatar M, Stroick M, Griebe M et al.* Brain temperature during 340-khz pulsed ultrasound insonation: a safety study for sonothrombolysis. *Stroke* (2006) 37: pp. 1883-1887.
- [Fercher, 1999] Adolf Friedrich Fercher. Medizinische physik; physik für mediziner, pharmazeuten und biologen. . Springer Verlag Wien, New York, 1999.
- Fleige S, Pfaffl MW* Rna integrity and the effect on the real-time qrt-pcr performance. *Mol. Aspects Med.* (2006) 27: pp. 126-139.
- Folkman J, Shing Y* Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* (1992) 267: pp. 10931-10934.
- Fowlkes, 2000 Mechanical bioeffects from diagnostic ultrasound: aium consensus statements. american institute of ultrasound in medicine. . 2000.
- Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB et al.* The role of heat shock proteins hsp70 and hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* (2005) 21: pp. 379-392.
- Furlan A, Higashida R, Wechsler L et al.* Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. the proact ii study: a randomized controlled trial. prolyse in acute cerebral thromboembolism. *JAMA* (1999) 282: pp. 2003-2011.
- Furusawa Y, Zhao Q, Hassan MA et al.* Ultrasound-induced apoptosis in the presence of sonazoid and associated alterations in gene expression levels: a possible therapeutic application. *Cancer Lett.* (2009) : .
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL et al.* Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1h-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* (1995) 48: pp. 184-188.

Gerriets T, Postert T, Goertler M et al. Dias i: duplex-sonographic assessment of the cerebrovascular status in acute stroke. a useful tool for future stroke trials. *Stroke* (2000) 31: pp. 2342-2345.

Gerriets T, Stolz E, Walberer M et al. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* (2004) 35: pp. 566-571.

Ginsberg MD Busto R Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* (1989) 20: pp. 1627-1642.

Ginsberg MD Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 thomas willis lecture. *Stroke* (2003) 34: pp. 214-223.

GG Glenner Tetrazolium salts. Little RD (ed.) () Conn's Biological Steins, Baltimore: .

Goertler M, Allendoerfer J, von Reutern G Design of a multicentre study on neurosonology in acute ischaemic stroke. a project of the neurosonology research group of the world federation of neurology. *Eur J Ultrasound* (2002) 16: pp. 115-120.

Greenberg DA, Jin K Khan AA Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant. *Curr Opin Pharmacol* (2008) 8: pp. 20-24.

Hacke W, Donnan G, Fieschi C et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of atlantis, ecass, and ninds rt-pa stroke trials. *Lancet* (2004) 363: pp. 768-774.

Hajat C, Hajat S Sharma P Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome : a meta-analysis of studies in patients. *Stroke* (2000) 31: pp. 410-414.

Hamann GF [acute cerebral infarct: physiopathology and modern therapeutic concepts]. *Radiologe* (1997) 37: pp. 843-852.

Hamm CW, Steffen W, Terres W et al. Intravascular therapeutic ultrasound thrombolysis in acute myocardial infarctions. *Am. J. Cardiol.* (1997) 80: pp. 200-204.

Hara T, Mies G, Hata R et al. Gene expressions after thrombolytic treatment of middle cerebral artery clot embolism in mice. *Stroke* (2001) 32: pp. 1912-1919.

Harrigan MR, Ennis SR, Masada T et al. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema. *Neurosurgery* (2002) 50: pp. 589-598.

Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC et al. The use of quantitative rt-pcr to measure mrna expression in a rat model of focal ischemia--caspase-3 as a case study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (2000) 75: pp. 143-149.

Harrison DC, Davis RP, Bond BC et al. Caspase mrna expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (2001) 89: pp. 133-146.

- Hayashi T, Abe K, Suzuki H et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* (1997) 28: pp. 2039-2044.
- Hayashi T, Noshita N, Sugawara T et al. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2003) 23: pp. 166-180.
- Herdegen T, Skene P, Bahr M The c-jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* (1997) 20: pp. 227-231.
- Horder MM, Barnett SB, Vella GJ et al. Ultrasound-induced temperature increase in guinea-pig fetal brain in utero: third-trimester gestation. *Ultrasound Med Biol* (1998) 24: pp. 1501-1510.
- Hossmann KA Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* (1996) 8: pp. 195-208.
- Hynynen K Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008) 60: pp. 1209-1217.
- Iadecola C Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* (1997) 20: pp. 132-139.
- Imura T, Shimohama S, Sato M et al. Differential expression of small heat shock proteins in reactive astrocytes after focal ischemia: possible role of beta-adrenergic receptor. *J. Neurosci.* (1999) 19: pp. 9768-9779.
- Inubushi T, Tanaka E, Rego EB et al. Effects of ultrasound on the proliferation and differentiation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol* (2008) 79: pp. 1984-1990.
- Iwata A, Masago A, Yamada K Expression of basic fibroblast growth factor mRNA after transient focal ischemia: comparison with expression of c-fos, c-jun, and hsp 70 mRNA. *J. Neurotrauma* (1997) 14: pp. 201-210.
- Jain RK Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* (2001) 7: pp. 987-989.
- Jestedt R & Sandritter W [experiences with the TTC- (triphenyltetrazoliumchloride-) reaction for the pathological-anatomical diagnosis of fresh myocardial infarct.]. *Z Kreislaufforsch*, 48, pp. 802-809 () : .
- Joshi CN, Jain SK, Murthy PS An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* (2004) 13: pp. 11-17.
- Justicia C, Planas AM Transforming growth factor- α acting at the epidermal growth factor receptor reduces infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1999) 19: pp. 128-132.
- Khan AA, Wang Y, Sun Y et al. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2006) 103: pp. 17944-17948.

- Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR et al.* Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* (1996) 7: pp. 1339-1346.
- Koch S, Pohl P, Cobet U et al.* Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound Med Biol* (2000) 26: pp. 897-903.
- Koizumi, J., Y. Yoshida, Nakazawa, G. Ooneda* Experimental studies of ischemic brain edema i: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 1-8 (1986) : .
- Kovács Z, Ikezaki K, Samoto K et al.* Vegf and flt. expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* (1996) 27: p. 1865-72; discussion 1872-3.
- Krueger K Busch E* Protocol of a thromboembolic stroke model in the rat: review of the experimental procedure and comparison of models. *Invest Radiol* (2002) 37: pp. 600-608.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P et al.* Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* (1994) 25: pp. 1794-1798.
- Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T et al.* Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* (1995) 26: p. 1655-7; discussion 1658.
- Heinrich Kuttruff. Physik und technik des ultraschalls. . Hirzel Verlag, Stuttgart, 1988.
- Kwon TH, Sun D, Daugherty WP et al.* Effect of perfluorocarbons on brain oxygenation and ischemic damage in an acute subdural hematoma model in rats. *J. Neurosurg.* (2005) 103: pp. 724-730.
- Laing RJ, Jakubowski J Laing RW* Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. which method works best?. *Stroke* (1993) 24: p. 294-7; discussion 297-8.
- Lawrie A, Brisken AF, Francis SE et al.* Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene Ther.* (2000) 7: pp. 2023-2027.
- Lennmyr F, Terént A, Syvänen A et al.* Vascular endothelial growth factor gene expression in middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* (2005) 49: pp. 488-493.
- Li RC, Lee SK, Pouranfar F et al.* Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res.* (2006) 1096: pp. 173-179.
- Lin TN, Wang CK, Cheung WM et al.* Induction of angiopoietin and tie receptor mrna expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2000) 20: pp. 387-395.
- Liu Y, Kon T, Li C et al.* High intensity focused ultrasound-induced gene activation in solid tumors. *J Acoust Soc Am* (2006) 120: pp. 492-501.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* (1989) 20: pp. 84-91.

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G Apoptosis inducing factor (aif): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* (1999) 6: pp. 516-524.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J et al. Apoptosis inducing factor (aif): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* (1999) 6: pp. 516-524.
- Lu QL, Liang H, Partridge T et al. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther.* (2003) 10: pp. 396-405.
- Luo H, Steffen W, Cercek B et al. Enhancement of thrombolysis by external ultrasound. *Am. Heart J.* (1993) 125: pp. 1564-1569.
- [Masuhr & Neumann, 2005] Masuhr KF, Neumann M. Neurologie. . Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2005.
- Matsuda S, Umeda M, Uchida H et al. Alterations of oxidative stress markers and apoptosis markers in the striatum after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neural Transm* (2009) 116: pp. 395-404.
- H.-J. Maurer. Physik der bildgebenden verfahren in der medizin. Maurer und Zieler (Ed.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York Tokyo, 1984.
- McDannold N, Vykhodtseva N, Hynynen K Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index. *Ultrasound Med Biol* (2008) 34: pp. 834-840.
- Meunier JM, Holland CK, Lindsell CJ et al. Duty cycle dependence of ultrasound enhanced thrombolysis in a human clot model. *Ultrasound Med Biol* (2007) 33: pp. 576-583.
- Miller DL, Thomas RM, Frazier ME Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in dna of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide. *Ultrasound Med Biol* (1991) 17: pp. 729-735.
- Millner, Rudolf; Ulrich Cobet, Hellmut Grossmann und andere. Ultraschalltechnik - Grundlagen und Anwendungen. Rudolf Millner (Ed.). VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1987.
- Molina CA, Ribo M, Rubiera M et al. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-mhz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* (2006) 37: pp. 425-429.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1989) 29: pp. 365-402.
- Nathan C, Xie QW Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* (1994) 78: pp. 915-918.

- Nedelmann M, Eicke BM, Lierke EG et al. Low-frequency ultrasound induces nonenzymatic thrombolysis in vitro. *J Ultrasound Med* (2002a) 21: pp. 649-656.
- Nedelmann M, Eicke BM, Nolle F et al. [the ultrasound contrast medium levovist increases the thrombolytic effect of low frequency ultrasound]. *Med. Klin. (Munich)* (2002b) 97: pp. 216-220.
- Nedelmann M, Eicke BM, Dieterich M. Functional and morphological criteria of internal jugular valve insufficiency as assessed by ultrasound. *J Neuroimaging* (2005) 15: pp. 70-75.
- Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B et al. Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain Res.* (2007) 1130: pp. 188-196.
- Nedelmann M, Reuter P, Walberer M et al. Detrimental effects of 60 khz sonothrombolysis in rats with middle cerebral artery occlusion. *Ultrasound Med Biol* (2008a)
- Nedelmann M, Gerriets T, Kaps M [therapeutic ultrasound of acute cerebral artery occlusion.]. *Nervenarzt* (2008b) 79: pp. 1399-1406.
- Nedergaard M. Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.* (1988) 77: pp. 81-101.
- Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* (2005) 50: pp. 281-286.
- Newmeyer DD, Bossy-Wetzell E, Kluck RM et al. Bcl-x1 does not inhibit the function of apaf-1. *Cell Death Differ.* (2000) 7: pp. 402-407.
- NINDS (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995 Dec 14;333(24):1581-7 (1995)
- Noshita N, Lewén A, Sugawara T et al. Evidence of phosphorylation of akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2001) 21: pp. 1442-1450.
- Orten JM. *NO Human biochemistry. 9th ed. St. Louis: CV Mosby, (1975) : p. pp. 173-252.*
- Osuga H, Hakim AM. Relevance of interstitial glutamate to selective vulnerability in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1994) 14: pp. 343-347.
- Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW [neuronal apoptosis following cerebral ischemia. basis, physiopathology and treatment strategies]. *Anaesthesist* (2001) 50: pp. 905-920.
- Park I, Meno JR, Witt CE et al. Subarachnoid hemorrhage model in the rat: modification of the endovascular filament model. *J. Neurosci. Methods* (2008) 172: pp. 195-200.
- Patrick JT, Nolting MN, Goss SA et al. Ultrasound and the blood-brain barrier. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1990) 267: pp. 369-381.

- Pignataro G, Scorziello A, Di Renzo G et al.* Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *FEBS J.* (2009) 276: pp. 46-57.
- Planas AM, Justicia C, Soriano MA et al.* Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive glia following transient focal ischemia in the rat brain. *Glia* (1998) 23: pp. 120-129.
- Poeck, Klaus; WH. Neurologie. Springer Verlag, Heidelberg, 2006.
- Porter AG Jänicke RU* Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* (1999) 6: pp. 99-104.
- Pounder NM Harrison AJ* Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics* (2008) 48: pp. 330-338.
- Prichard JW Grossman RI* New reasons for early use of mri in stroke. *Neurology* (1999) 52: pp. 1733-1736.
- Rothwell NJ Relton JK* Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischaemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* (1993) 5: pp. 178-198.
- Saguchi T, Onoue H, Urashima M et al.* Effective and safe conditions of low-frequency transcranial ultrasonic thrombolysis for acute ischemic stroke: neurologic and histologic evaluation in a rat middle cerebral artery stroke model. *Stroke* (2008) 39: pp. 1007-1011.
- Sairanen T, Carpén O, Karjalainen-Lindsberg ML et al.* Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke. *Stroke* (2001) 32: pp. 1750-1758.
- Samdani AF, Dawson TM Dawson VL* Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* (1997) 28: pp. 1283-1288.
- Sant'Anna EF, Leven RM, Viridi AS et al.* Effect of low intensity pulsed ultrasound and bmp-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J. Orthop. Res.* (2005) 23: pp. 646-652.
- Sasaki T, Kitagawa K, Yagita Y et al.* Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *J. Neurosci. Res.* (2006) 84: pp. 1187-1196.
- Oliver Schleif* Ein beitrag zur tiergerechten haltung der ratte anhand der literatur. (2001) : .
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E et al.* A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry. *Stroke* (1998) 29: pp. 2162-2170.
- Schneider F, Gerriets T, Walberer M et al.* Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low-frequency 20-khz ultrasound: a safety study in rats. *Stroke* (2006) 37: pp. 1301-1306.

- Sena K, Leven RM, Mazhar K et al.* Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol* (2005) 31: pp. 703-708.
- Shang A, Zhou D, Wang L et al.* Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults. *Brain Res.* (2006) 1078: pp. 219-226.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G et al.* Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* (2003) 23: pp. 3394-3406.
- Shimamura N, Matchett G, Tsubokawa T et al.* Comparison of silicon-coated nylon suture to plain nylon suture in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J. Neurosci. Methods* (2006) 156: pp. 161-165.
- Shimazu M, Mizushima H, Sasaki K et al.* Expression of c-fos in the rat cerebral cortex after focal ischemia and reperfusion. *Brain Res. Bull.* (1994) 33: pp. 689-697.
- Sibilia M, Steinbach JP, Stingl L et al.* A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the egf receptor. *EMBO J.* (1998) 17: pp. 719-731.
- Siegel RJ, Atar S, Fishbein MC et al.* Noninvasive transcutaneous low frequency ultrasound enhances thrombolysis in peripheral and coronary arteries. *Echocardiography* (2001) 18: pp. 247-257.
- Siegenthaler W; Blum HE. *Klinische pathophysiologie.* Thieme Stuttgart, New York, 2006.
- Sipahi I, Nicholls SJ, Tuzcu EM* Intravascular ultrasound in the current percutaneous coronary intervention era. *Cardiol Clin* (2006) 24: p. 163-73, v.
- Sirén AL, Heldman E, Doron D et al.* Release of proinflammatory and prothrombotic mediators in the brain and peripheral circulation in spontaneously hypertensive and normotensive wistar-kyoto rats. *Stroke* (1992) 23: p. 1643-50; discussion 1650-1.
- Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA et al.* Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke* (2002) 33: pp. 816-824.
- Statistisches Bundesamt* Gesundheit im alter. (2006) : p. 4.
- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, King JS et al.* Preconditioning reprograms the response to ischemic injury and primes the emergence of unique endogenous neuroprotective phenotypes: a speculative synthesis. *Stroke* (2007) 38: pp. 680-685.
- Stratmeyer ME, Christman CL* Biological effects of ultrasound. *Women Health* (1982) 7: pp. 65-81.
- Stratmeyer ME, Greenleaf JF, Dalecki D et al.* Fetal ultrasound: mechanical effects. *J Ultrasound Med* (2008) 27: p. 597-605; quiz 606-9.

Sun Y, Jin K, Mao XO et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) 98: pp. 15306-15311.

Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG et al. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (koizumi) in rats. *J. Neurol. Sci.* (1997) 153: pp. 8-11.

Tang C, Lu D, Tan T et al. Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/integrin-linked kinase/akt/mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* (2007) 282: pp. 25406-25415.

Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K et al. Local delivery of plasmid dna into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* (2002) 105: pp. 1233-1239.

Trübestein G, Engel C, Etzel F et al. Thrombolysis by ultrasound. *Clin Sci Mol Med Suppl* (1976) 3: p. 697s-698s.

Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann. Transplant.* (2004) 9: pp. 84-87.

Tureyen K, Brooks N, Bowen K et al. Transcription factor early growth response-1 induction mediates inflammatory gene expression and brain damage following transient focal ischemia. *J. Neurochem.* (2008) 105: pp. 1313-1324.

Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Invest Radiol* (1997) 32: pp. 723-727.

van der Weerd L, Lythgoe MF, Badin RA et al. Neuroprotective effects of hsp70 overexpression after cerebral ischaemia--an mri study. *Exp. Neurol.* (2005) 195: pp. 257-266.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* (2002)

Verrall, R.E., Seghal, C.M. Sonoluminescence. *Ultrasound: Its Chemical, Physical and Biological Effects* (1988) Suslick, K. S. (Ed.), VCH Publishers, New York: .

Von der Decken A, Campbell PN The effect of ultrasonic vibrations on the protein-synthesizing activity of microsome preparations from rat liver. *Biochem. J.* (1964) 91: pp. 195-201.

Walberer, Maureen Ilona. Das Markosphärenmodell - Evaluation eines neuen Tiermodells zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte. Gießen. 2005.

Walberer M, Stolz E, Müller C et al. Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between wistar and sprague-dawley rats using mri). *Lab. Anim.* (2006) 40: pp. 1-8.

Wang Y, Liu R, Wang L et al. Effect of huwentoxin-i on the fas and tnf apoptosis pathway in the hippocampus of rat with global cerebral ischemia. *Toxicon* (2007) 50: pp. 1085-1094.

Wei L, Erinjeri JP, Rovainen CM et al. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke* (2001) 32: pp. 2179-2184.

Weiller C, Ramsay SC, Wise RJ et al. Individual patterns of functional reorganization in the human cerebral cortex after capsular infarction. *Ann. Neurol.* (1993) 33: pp. 181-189.

West CM, Joseph L, Bhana S Epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *Br J Radiol* (2008) 81 Spec No 1: p. S36-44.

Wilhelm-Schwenkmezger T, Pittermann P, Zajonz K et al. Therapeutic application of 20-khz transcranial ultrasound in an embolic middle cerebral artery occlusion model in rats: safety concerns. *Stroke* (2007) 38: pp. 1031-1035.

Winnacker E From genes to clones: introduction to gene technology. () VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: .

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* (2000) 407: pp. 242-248.

Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q et al. Vegf enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* (2000) 106: pp. 829-838.

Zhang ZG, Zhang L, Tsang W et al. Correlation of vegf and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2002) 22: pp. 379-392.

Zheng Z, Kim JY, Ma H et al. Anti-inflammatory effects of the 70 kda heat shock protein in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2008) 28: pp. 53-63.

8 Versicherung

Versicherung gemäß Paragraph § 11, Absatz 3(d) der Promotionsordnung im Studiengang Biologie

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe. Weiterhin bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit, oder Teile davon, nicht als Arbeit in einer anderen Fakultät oder für eine andere Prüfung benutzt habe.

Mainz, den 07.01.2010

Peter R. Reuter

9 Lebenslauf

Zur Person

Name Peter Rudolf Reuter
Geburtsdaten: 15. Juli 1979 in Wiesbaden
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Berufserfahrung

- seit 05/2009
- Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Klinik/Gießen
 - (Prof. Dr. med. M. Kaps)
 - Durchführung von Studien im Bereich Ultraschallthrombolyse, sekundäre Neuroprotektion und Ischämie-Modelle
 - neurologische Beurteilung der Versuchstiere nach Durchführung der Experimente
 - MRT-Untersuchung der Versuchstiere und histologische Auswertung
 - Betreuung medizinischer Doktoranden
 - Präsentation der Ergebnisse auf nationalen/Internationalen Kongressen
- 05/2006 – 05/2009
- Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Neurologischen Klinik/Mainz
 - (Prof. Dr. med. M. Dieterich/Komm.Leiter Prof. Dr. med F. Thömke)
 - Durchführung von Studien im Bereich Ultraschallthrombolyse und Ischämie-Modelle
 - neurologische Beurteilung der Versuchstiere nach Durchführung der Experimente
 - histologische Auswertung
 - Betreuung medizinischer Doktoranden
 - Präsentation der Ergebnisse auf nationalen/Internationalen Kongressen
- Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neurochirurgische Pathophysiologie/Mainz (Prof. Dr. O. Kempfski)
- Durchführung von Studien im Bereich Neuroprotektion (Schädel-Hirn-Trauma)
 - Betreuung medizinischer Doktoranden
 - Präsentation der Ergebnisse auf nationalen/Internationalen Kongressen

Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung/Mainz (Prof. Dr. T. Hankeln)

- Durchführung von Studien im Bereich Ultraschallthrombolyse mit molekulargenetischen Techniken (insbesondere quantitative Real-Time RT-PCR)
- Betreuung verschiedener Praktika (Grundpraktikum, FI- und FII-Praktikum) und Diplomanden

Studium

10/2000 – 04/2006 **Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

- Studiengang: Biologie
- Kernfächer im Hauptstudium: Zoologie, Botanik, Publizistik
- Abschluss: Diplom-Biologe mit der Note 1,7

07/2005 – 04/2006 **Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik (Prof. Dr. W. Wernicke)**

Thema: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am pflanzlichen gamma-Tubulin

Studentische Nebentätigkeiten

05/2005 – 08/2005 HiWi im Zoologischen Anfängerpraktikum (geleitet von Prof. Stöcker)

02/2004 – 02/2005 Verkäufer bei Agrarhandel Schröder

12/2001 – 08/2003 Verkäufer bei der Diehl Hausgeräte GmbH

Schulbildung / Zivildienst

08/1999 – 06/2000 Zivildienst im Nachbarschaftshaus Wiesbaden e.V.

08/1990 – 07/1999 Gutenberggymnasium/Wiesbaden, Abitur mit der Note 2,2

Sprachkenntnisse

- Deutsch - Muttersprache
- Englisch - fließend in Wort und Schrift

Ehrenamtliche Tätigkeiten

- 01/2002 – 12/2005 **Aktives, ehrenamtliches Mitglied der Johanniter Reiterstaffel Ortsgruppe Untertaunus**
- 02/2002 – 02/2005 **Vorstandsmitglied der Interessengemeinschaft der Gespannfahrer Wiesbaden und Umgebung (IGWU) e.V. (Beauftragter des Freizeit- und Breitensports)**
- 04/2003: Vortrag über „Ektoparasiten beim Pferd“ im Rahmen des monatlichen Treffens (IGWU)
 - 10/2005: Vortrag über „Funktion der Muskulatur und auftretende Krankheiten beim Pferd“ im Rahmen des monatlichen Treffens (IGWU)

Persönliche Interessen

- Musik, Tanzen
- Rad fahren, wandern
- Pferdesport
- Kochen

Zusatzqualifikationen**08/2007-04/2008****Allgemeines Promotionskolleg Johannes-Gutenberg Universität Mainz**

Module: Einführung in das Wissenschaftssystem
 Präsentation und Rhetorik
 Projekt-, Zeit- und Selbstmanagement
 Informations- und Wissensmanagement
 Wissenschaftliches Publizieren und Schreiben
 Kooperation, Konflikt und Kommunikation

03/2009-04/2009**Bildungszentrum Pulverturm Fort- und Weiterbildung****Johannes-Gutenberg Universität Mainz/Klinikum**

Modul: Wie eröffne ich Gespräche?
 Projekte und Arbeitsaufträge erfolgreich zum Ziel führen

Eingeworbene Drittmittel**Thema Ultraschall-Thrombolyse**

Mainzer Forschungsförderungsprogramm (MAIFOR) 2007 € 23.500,-

Stipendien:

Young Investigator Bursary for participation in BRAIN07, Osaka, Japan
 (www.brain07.com)

Originalarbeiten

Nedelmann M, Reuter P, Walberer M, Sommer C, Alessandri B, Schiel D, Ritschel N, Kempfski O, Kaps M, Mueller C, Bachmann G, Gerriets T.
 "Detrimental effects of 60 kHz sonothrombolysis in rats with middle cerebral artery occlusion." *Ultrasound Med Biol.* 2008 Dec; 34(12):2019-27. Epub 2008 Aug 23.

Kongress- /Tagungsbeiträge**Vorträge***DGNC Tagung 2007 – Göttingen/Deutschland*

"Niederfrequenter Ultraschall (60 kHz) wirkt schädlich auf ischämisches Hirngewebe und hat Einfluss auf die Genexpression im Cortex"

DGNC Tagung 2008 – Mainz/Deutschland

„Niederfrequenter Ultraschall mit variiertem Duty Cycle: Wirkung auf ischämisches Hirngewebe und das Innenohr“

NeuroDoWo 2008 – Saarbrücken/Deutschland

„Gene expression in the cortex after exposure to low frequency (60 kHz) ultrasound“

vorgestellte Abstracts:*Brain 2007 (www.brain07.com) - Osaka/Japan*

"Low frequency (60 kHz) transcranialtherapeutic ultrasound is detrimental and leads to infarct enlargement in middle cerebral artery occlusion in rats"

IAK Neuro 2008 – Mainz/Deutschland

„Gene expression in the cortex after exposure to low frequency (60kHz) ultrasound“

Neurorepair 2008 – Magdeburg/Deutschland

"Gene expression in the cortex after exposure to low frequency (60kHz) ultrasound"

Brain 2009 (www.brain09.com) – Chicago/USA

"Low-frequency ultrasound (60 kHz) with varied Duty Cycle: Effects on ischemic brain tissue and the inner ear"

"Gene expression in the brain after insonation with ultrasound: A comparison between experimental (60 and 488kHz) and diagnostic (2MHz) ultrasound probes"

10 Veröffentlichungen

Auf den nachfolgenden Seiten befinden sich die Originalarbeit und die veröffentlichten Abstracts.



● *Original Contribution*

DETRIMENTAL EFFECTS OF 60 KHZ SONOTROMBOLYSIS IN RATS WITH MIDDLE CEREBRAL ARTERY OCCLUSION

MAX NEDELMANN,^{†*} PETER REUTER,[‡] MAUREEN WALBERER,^{†*} CLEMENS SOMMER,[§]
 BEAT ALESSANDRI,[¶] DANIEL SCHIEL,^{†*} NOUHA RITSCHER,^{†*} OLIVER KEMPSKI,[¶]
 MANFRED KAPS,^{*} CLEMENS MUELLER,[†] GEORG BACHMANN,[†] and TIBO GERRIETS^{†*}

^{*}Department of Neurology, Justus Liebig University, Giessen, Germany; [†]Department of Experimental Neurology, Justus Liebig University, Giessen and Kerckhoff Clinic, Bad Nauheim, Germany; [‡]Department of Neurology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; [§]Department of Neuropathology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany; and [¶]Institute for Neurosurgical Pathophysiology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

(Received 19 November 2007; revised 21 May 2008; in final form 8 June 2008)

Abstract—Recent studies have raised concerns about the safety of low frequency ultrasound in transcranial therapeutic application in cerebral ischemia. This study was designed to evaluate safety aspects and potential deleterious effects of low frequency, 60 kHz ultrasound in treatment of experimental middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. Forty-five male Wistar rats were submitted to either temporary (90 min; groups I and II) or permanent MCAO (groups III and IV) using the suture technique. All animals received recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) starting 90 min after the beginning of occlusion. Groups I and III were additionally treated with 60 kHz ultrasound (time average acoustic intensity 0.14 W/cm², duty cycle 50%). Outcome assessment consisted of magnetic resonance imaging (MRI) and clinical evaluation after 5 and 24 h, and histology (perfusion fixation after 24 h). Overall mortality was higher in animals treated with ultrasound (43% versus 29% in controls). Most animals died during the insonation period (25% in group I, 36% in group III, no animals in the corresponding control groups; $p < 0.05$). Histology revealed disseminated microscopic intracerebral bleeding and subarachnoid hemorrhage as one possible cause of death. After temporary occlusion, the hemispheric ischemic lesion volume was more than doubled in animals treated with ultrasound (20.3% \pm 14.1% versus 8.6% \pm 5.1% in controls; $p < 0.05$). No difference in lesion volume was seen after permanent MCAO. Neurological assessment showed impairment of hearing as an additional specific side effect in ultrasound treated animals (65%, no impairment in controls). Although the results are not directly transferable to the human setting, this study clearly demonstrates the potential limitations of low frequency therapeutic ultrasound and the importance of pre-clinical safety assessment. (E-mail: max.nedelmann@neuro.med.uni-giessen.de) © 2008 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology.

Key Words: Ultrasound, Thrombolysis, Stroke, Safety, Efficacy.

INTRODUCTION

Transcranial application of therapeutic ultrasound is an interesting, yet still experimental option to increase the efficacy of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) treatment of acute cerebral vessel occlusion. Clinical studies have reported a significantly increased recanalisation rate and a potentially improved outcome in patients receiving transcranial Doppler (Alexandrov et al. 2004; Molina et al. 2006) and duplex insonation (Eggers

et al. 2003, 2005) during rt-PA treatment. The largest clinical study to date, the combined lysis of thrombus in brain ischemia using transcranial ultrasound and systemic t-PA trial (CLOTBUST)-trial, noted a recanalisation rate that was more than doubled (46% versus 18%), when continuous 2-h insonation with transcranial 2-MHz Doppler was added to standard rt-PA treatment (Alexandrov et al. 2004).

Experimental results suggest that ultrasound parameters different from the commercially available diagnostic tools may lead to improved treatment efficacy. In particular, the choice of the applied ultrasound frequency may be of importance, with a more pronounced treatment

Address correspondence to: Max Nedelmann, MD, Department of Neurology, Justus Liebig University Giessen, Am Steg 14, 35392 Giessen, Germany. E-mail: max.nedelmann@neuro.med.uni-giessen.de

effect at lower frequencies (Behrens et al. 2001; Ishibashi et al. 2002; Suchkova et al. 2002; Nedelmann et al. 2005). However, there is also evidence, that incautious choice of ultrasound different from the diagnostic parameter setting may cause severe side effects on brain tissue. A recent clinical multicenter study on transcranial therapeutic application of 300 kHz ultrasound demonstrated an increased rate of cerebral hemorrhage (transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia (TRUMBI) trial: Daffertshofer et al. 2005). Ultrasound induced blood brain barrier disruption was suggested as one possible cause (Reinhard et al. 2006).

In a previous study on transcranial continuous wave 20 kHz ultrasound (insonation time 20 min), we have found evidence of vasogenic and cytotoxic edema formation and even necrosis in healthy rat brain tissue (Schneider et al. 2006). These effects were dose dependent and were found at intensities ranging from 0.5 to 2.6 W/cm². Intensities below this threshold caused no pathological findings on magnetic resonance imaging scans and histology specimens. Application of low intensity 20 kHz ultrasound (0.2 W/cm²) that had previously not shown side effects in healthy rat brain resulted in an increased death rate of animals subjected to embolic middle cerebral artery occlusion (MCAO) (Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007). As histological evaluation had revealed excessive hemispheric infarction in some of the deceased animals, a potential adverse effect of ultrasound on the ischemic tissue had been postulated.

This study was designed to further evaluate the previously noted deleterious effects of transcranially applied low intensity low frequency ultrasound on ischemic tissue and to gain more insight into the nature of occurring side effects. To extend the knowledge on bioeffects of ultrasound at the low frequency range, a slightly higher (60 kHz) frequency was chosen. An experimental model of MCAO in rats was used. Evaluation was based on MRI, histology and functional testing.

MATERIALS AND METHODS

Animal preparation

Forty-five male Wistar rats weighing 318 ± 32 g were used in the present study (Harlan Winkelmann, Borchon, Germany). One animal that died during the initial operation procedure was excluded from evaluation. Thus, 44 rats were included in the study.

All experiments were performed in accordance with the German animal protection legislation and were approved by the regional ethics committee (Az 1.5 177-07/051-43).

The animals were anesthetized with 5% isoflurane inhalation for 2 min. Anesthesia was maintained with 2%

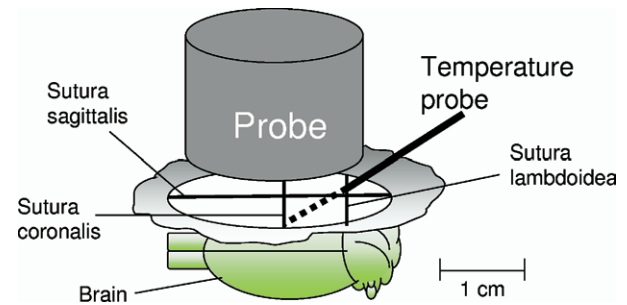


Fig. 1. Experimental set-up: Positioning of the ultrasound probe in relation to the skull and the rat brain. Distance of the probe surface to the skull was 5 mm. The temperature probe for evaluation of intracranial temperature during sonication was placed in the ischemic area in a separate set of experiments.

to 3% isoflurane inhalation at 0.5 L/min during surgery. Body temperature was continuously monitored with a rectal probe and maintained at 36.5°C to 37.0°C. Rats were subjected to MCAO by use of the filament model as previously described (Schmid-Elsaesser et al. 1998). In brief, the right external carotid artery (ECA) and the right common carotid artery (CCA) were ligated permanently, while another transient ligation of the internal carotid artery (ICA) was performed right after the bifurcation. A 4-0 silicone-coated nylon suture was introduced through a small arteriotomy between the two ligations of the CCA. The occluder was advanced into the ICA 20 to 25 mm beyond the carotid bifurcation until mild resistance indicated that the tip was lodged in the anterior cerebral artery and, thus, blocked blood flow to the MCA. In temporary occlusion, reperfusion was induced by removing the suture 90 min after MCAO. For permanent occlusion, the suture was left in place.

For transcranial ultrasound application, the animals were prepared as previously described (Schneider et al. 2006). In short, the scalp was mobilized from the skull by longitudinal incision. The skin flaps were attached to a ring (diameter 40 mm, 10 mm above the skull) to form a basin, that was then filled with water. The ultrasound probe (BANDELIN electronic, Berlin, Germany) was placed 5 mm above the skull and into the basin, in order to ascertain full transmission of sound to the skull. The transducer had a plane circular surface with an area of 3.5 cm², thus, being similar to the 20 kHz probes that were used in our previous studies (Schneider et al. 2006; Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007; Fig. 1). Twenty-four hours after surgery, the animals were deeply anaesthetized and submitted to transcardial perfusion fixation with 4% paraformaldehyde.

Experimental set-up

The animals were randomly subjected to experimental groups I to IV. Groups I and II received tempo-

rary; groups III and IV permanent MCAO. All animals received rt-PA (Actilyse™, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) from 90 to 150 min after the beginning of occlusion. Rt-PA was given at a dose of 10 mg/kg body weight, with 10% as bolus and the rest as a 1-h infusion. In addition to rt-PA, groups I and III were treated with 60 kHz ultrasound. Ultrasound was applied at an electrical intensity of 0.2 W/cm² (time average (I_{TA}), calculated and controlled by measured active high frequency power by a power analyzer connected to the probe), a duty cycle of 50% and a pulse rate of 10 Hz (resulting in 0.4 W/cm² during the on cycle). Based on calorimetric evaluation, acoustic intensity of the transducer was 0.14 W/cm². As a consequence of the wide (hemispherical) sound beam created by the probe, this set-up leads to global insonation of the rat's skull and brain, thereby allowing evaluation of the ischemic and of the non-ischemic brain hemispheres.

Ultrasound was applied in cycles of 2 min with a 30 s pause for 10 min, then followed by a pause of 5 min. These 15 min-cycles were repeated four times, resulting in an intermittent insonation time of 1 h and a total application time of ultrasound of 32 min. The control groups (groups II and IV) received sham insonation, with the same ultrasound setup as in groups I and III, but the device not being switched on.

Temperature evaluation. The intermittent insonation scheme (Ishibashi *et al.* 2002) was chosen in order to avoid tissue heating from prolonged insonation periods. As this scheme has not been previously evaluated for its effects on intracranial temperature, efficacy was assessed in a separate set of experiments in six animals. Operation procedures with occlusion of the right MCA were as above. A temperature probe was then placed through a small occipital burr hole into the ischemic right MCA territory (Fig. 1). Three animals were insonated following the intermittent scheme and three other animals had a continuous insonation over the whole period of 1 h.

Outcome assessment

Magnetic resonance imaging. The animals were fixed in a body restrainer with tooth-bar and a cone shaped head holder and were placed in an MRI spectrometer (Bruker PharmaScan 70/16, 7.0 T, 16 cm; Ettlingen, Germany). Respiratory rate was monitored with a pressure probe placed between the restrainer and the animal's thorax. Temperature was monitored using a rectal probe. Body temperature was maintained at 37°C by a thermostatically regulated and feedback controlled water flow system, consisting of a pump-driven cylindrical tube system surrounding the animal's body while sparing the head holder. The head holder was then placed

into a custom-designed linear polarized volume resonator (diameter 60 mm) and tuned and matched manually.

Diffusion weighted imaging. To map the apparent diffusion coefficient of water (ADC), diffusion-weighted images were acquired by use of a fat suppressing echo planar imaging (EPI)-sequence. An increase of the intracellular volume due to cell swelling as a cause of cytotoxic edema results in an almost immediate ADC-decline (Gerriets *et al.* 2004a, 2004b).

A volume shim with a volume selective double spin echo sequence (TR = 1 s, TE = 30 ms, voxel-size 10 x 8 x 15 mm³) was performed before the acquisition of the first diffusion series to optimize imaging quality. The achieved full width at half maximum (FWHM) of the waterline was about 25 to 35 Hz.

Six contiguous coronal slices with a thickness of 2 mm were collected with a field of view of 32 x 32 mm and a matrix size of 128 x 128 (TR = 3003 ms, TE = 38.6 ms, NEX = 4). A fourfold segmentation was used to reduce image artifacts caused by local field inhomogeneity. Five sets of coronal images were recorded for quantitative determination of ADC, with equidistant diffusion gradient values of 10, 40, 70, 100 and 130 mT/m and with a diffusion gradient duration (δ) of 9 ms and a gradient separation time (Δ) of 15 ms. This results in five b-Values of 6.96, 111.3, 340.8, 695.6 and 1175.5 s/mm². The acquisition time for each EPI sequence was 4.5 min.

T2-Imaging. T2-relaxation-time was mapped using a CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) spin echo sequence. This sequence is highly sensitive to the number of protons within the tissue and thus allows mapping and quantification of the brain water content and vasogenic edema formation (Gerriets *et al.* 2004a).

Six slices with a thickness of 2 mm were acquired with a field of view of 37 x 37 mm and a matrix size of 512 x 256 (TR = 3833.5 ms, 90° excitation and 180° rephasing pulses, NEX = 1). Twelve echoes were collected, starting with TE = 18ms (step size $\Delta TE = 18$ ms), resulting in a range from 18 to 216 ms. Acquisition time for each CPMG sequence was 16 min and 21 s.

Computer-aided planimetric assessment of the lesion and hemispheric volumes was performed using image analysis software (Image J 1.37v; National Institutes of Health, USA). Lesion volumes were corrected for the space occupying effect of brain edema as described previously using the following equation (Gerriets *et al.* 2004a):

$$\%HLV^c = \frac{HC_c - HV_i + LV^u}{HV_e} \cdot 100$$

where %HLV^c indicates edema-corrected lesion volume (in percent of the hemispheric volume); HV^c and HVⁱ

indicate contra- and ipsilateral hemispheric volume; LV^u indicates uncorrected lesion volume.

The ADC- and T2-maps were calculated by a least squares fit with use of the Image Processing Tool of the Paravision 2.1 software (Bruker, Ettlingen, Germany). T2-RT and ADC were calculated from regions-of-interest that were placed within the cortex, the basal ganglia and the trigeminal nerve on both hemispheres on all slices. Mean T2-RT- and ADC-values were calculated per animal.

Functional evaluation

Functional evaluation of surviving animals was performed at baseline and 5 and 24 h after induction of ischemia. Neurological deficits were studied by use of a previously described and validated Neuro score (Nedelmann et al., 2007). This score tests for different motor, coordinative and sensory items. Each item scores 0 (no impairment) or 10 (impairment), except for spontaneous walking (0: normal gait; 5: drifting/circling; 10: unable to walk on ground). Thus, overall functional impairment was scored from 0 (no impairment) to 90 (no reaction to any stimulus).

Used items were as follows: inability to fully extend left forelimb; instability to lateral push from right; tail suspension test. In this test, animals were gently lifted by the tail and impairment was assumed when animals flexed their body to the left and remained in that position in three consecutive attempts; walking on ground (see above); whisker movements on left side (present or absent); consciousness (normal or no reactions to stimuli); hearing (normal or no reaction to clapping of hands); sensory (normal or no reaction to left sided touch or prick); left-sided hemianopia (normal or repeatedly absent reaction to visual stimuli approaching from left).

Histology

For morphological analysis, the brains were carefully removed and immersion fixed in 4% formalin. Then, brains were sectioned at the level of the striatum, hippocampus and cerebellum including the brain stem. After paraffin-embedding, 3 μm thick sections of each level were cut and used for hematoxylin and eosin (HE) staining and immunohistochemical analysis. Immunohistochemistry was performed with monoclonal mouse antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:600; Dako), microtubule-associated protein 2 (MAP2; 1:1000; Sigma), macrophage glycoprotein CD68 (1:600; Dako), respectively, and a rabbit antiserum against the transcription factor c-fos (1:200; Sigma). Immunoreactivity was visualized by a universal immuno-enzyme polymer method (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). Sections were developed in diaminobenzidine with substrate (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA).

Histological analysis was performed by a blinded investigator (CS).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 12.0 for Windows. The χ^2 test was used for evaluation of death rates and impairment of hearing. Comparison of lesion volume and differences in functional outcome between groups with ultrasound treated and control animals were performed by the student's *t* test. ADC- and T2-weighted MRI data within regions-of-interest were analysed by an analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements, followed by a post hoc test (Tukey-Kramer). Means are expressed as \pm SD. A *p*-value < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

The mortality rate of the animals differed significantly among the different experimental groups. Mortality during the experimental procedure and follow-up was higher in animals treated with ultrasound, compared with the respective control groups and highest in permanent MCAO (Table 1). This difference was explained by a considerable mortality of ultrasound treated animals during the course of treatment. Thirty-six percent of the animals in group III and 25% of the animals in group I died during insonation, whereas no animals in the control groups died during the sham insonation period ($p < 0.05$ between groups III and IV).

As one possible cause of death, intracerebral and subarachnoid hemorrhage was found in some of the animals (Fig. 2). Hemorrhage was not confined to the site of the induced ischemic lesion but occurred at cerebral regions distant from ischemia. In two cases of ultrasound treated animals, disseminated intracerebral microbleedings were identified on HE staining (one permanent MCAO, one reperfusion). Subarachnoid hemorrhage, accentuated at the interhemispheric fissure and the adjacent circumference, was found in four ultrasound treated animals (two animals of each experimental group). Comparable bleedings were not seen in the control groups. Mild hemorrhagic transformation within the ischemic lesion occurred in two animals after permanent MCAO. One of these animals had been treated with ultrasound and the other had received sham insonation (Fig. 2).

MRI-derived ischemic lesion volumes of animals surviving the follow-up period are shown in Table 1. With regard to differences in lesion volume, there was a different pattern among reperfused and among permanently occluded animals. After reperfusion, there was a larger lesion volume among those animals treated with ultrasound (group I), compared with controls (group II).

Table 1. Lesion volume and outcome characteristics of the different experimental groups

| | Reperfusion | | Permanent MCAO | |
|--|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | Ultrasound (n = 12) | Sham (n = 10) | Ultrasound (n = 11) | Sham (n = 11) |
| Overall mortality (%) | 33 | 20 | 55 | 36 |
| Mortality during treatment (%) | 25 | 0 | 36* | 0 |
| Infarct volume (% HLV ^e) at 24 h | 20.3 ± 13.0* | 8.6 ± 5.1 | 37.8 ± 14.6 | 34.5 ± 12.6 |
| Neuro score at 24 h | 36.1 ± 14.1 | 25.0 ± 14.4 | 52.5 ± 9.4† | 37.1 ± 6.4 |
| Impairment of hearing (%) | 33 | 0 | 100‡ | 0 |

Infarct volume = % HLV^e indicates edema-corrected lesion volume (in percent of the hemispheric volume); Neuro score = A value of 0 indicates no impairment, 90 is maximum score; MCAO = middle cerebral artery occlusion.

* $p < 0.05$,

† $p < 0.01$,

‡ $p < 0.0001$; compared with sham insonation.

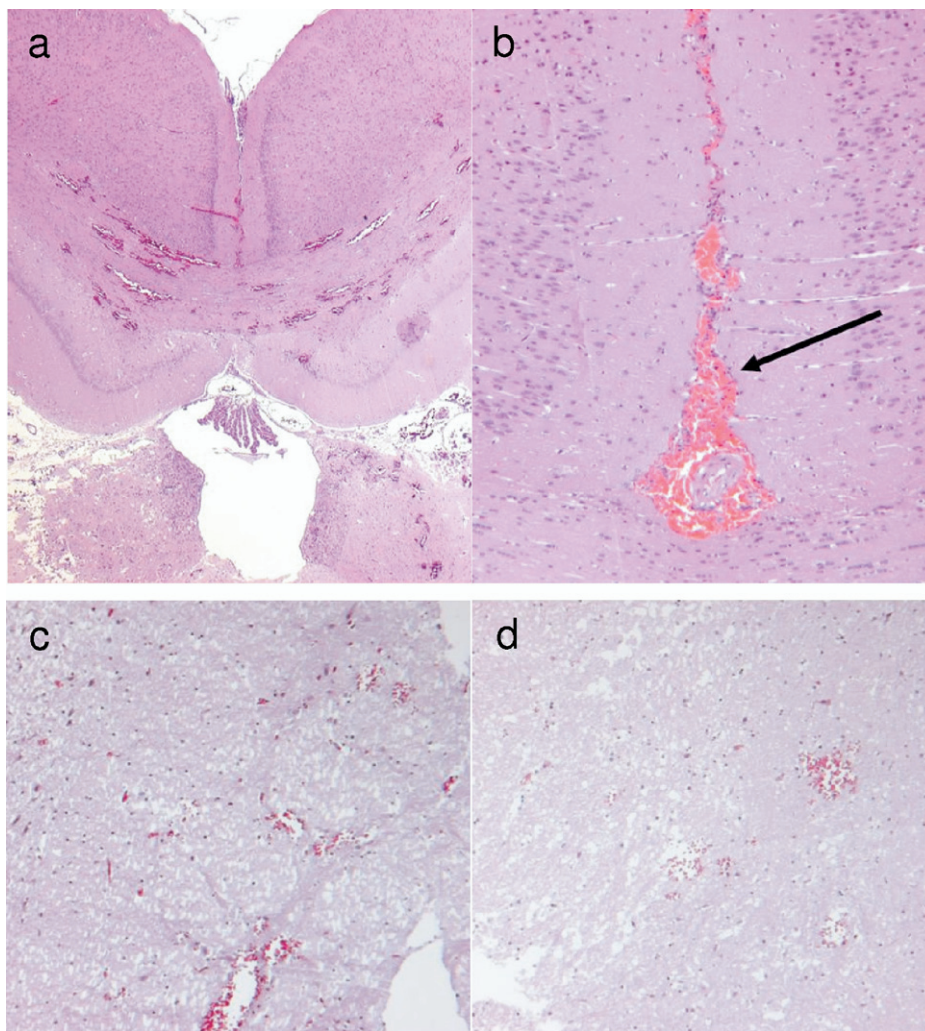


Fig. 2. (a) and (b). Two examples of ultrasound induced cerebral hemorrhage (HE staining). Both animals show disseminated microbleedings in both hemispheres (a), one animal additional subarachnoid hemorrhage (b, arrow); (c) and (d). Hemorrhagic transformation of the ischemic lesion occurred in two animals after permanent MCAO (Trichrom staining, magnification $\times 200$). One animal had been treated with ultrasound (c), the other had received sham insonation (d).

This difference was statistically significant after 5 and after 24 h ($p < 0.05$; data shown for 24 h). After permanent occlusion, there was no difference between ultrasound treated and sham insonated animals after 5 h and after 24 h.

Apart from the ischemic lesion and the described hemorrhagic events, there were no further signs of cerebral damage of the surviving animals on inspection of MRI and histology. No differences concerning astroglial activation, microglia/macrophages activation, damage of neurites or the stress response as determined immunohistochemically with antibodies against GFAP, CD68, MAP2 and c-fos, respectively, were detectable (Fig. 3).

Also, T2-RT and ADC-mapping within predefined cortical and subcortical regions-of-interest within the ischemic lesion, in the contralateral hemisphere and within the trigeminal nerve revealed no detectable differences between the different experimental groups, thus, giving no evidence of edema formation or damage to the blood brain barrier (data not shown).

Functional evaluation by use of the Neuro score gave worse results in animals being treated with ultrasound (Table 1). The difference was statistically significant between ultrasound treated and placebo treated animals in permanent MCAO ($p < 0.01$). Reperfused animals showed a nonsignificant trend towards a worse outcome after ultrasound treatment ($p = 0.13$). The differences in outcome were mainly due to a loss or impairment of hearing. When this item was removed from the Neuro score, the remaining items showed a nonsignificant trend towards a worse outcome in the ultrasound treated groups.

Impairment of hearing was found after ultrasound treatment and did not occur in the sham insonation groups. In the reperfusion group, one third of animals showed reduced or no reaction to acoustic stimuli. After permanent occlusion, all animals were affected ($p < 0.0001$; Table 1, Fig. 4).

Assessment of intracranial temperature changes gave different results for animals being insonated intermittently and animals having continuous insonation over a period of 1 h. Intermittent insonation, as used in the present study, resulted in only minor intracerebral temperature changes with all values below 1°C (Fig. 5). Continuous insonation produced a consistently higher temperature elevation with single values up to 4.6°C .

DISCUSSION AND SUMMARY

The principle results of our study demonstrate the potentially harmful effects of low frequency ultrasound in transcranial application. Insonation with 60 kHz ultrasound led to an increased mortality, an increased isch-

emic lesion volume and a worsened functional outcome of treated animals.

Although experimental data suggest a superior efficacy of transcranial low frequency ultrasound (Behrens et al. 2001), clinical experience on bioeffects of therapeutic application is scarce. A clinical multicentre trial using 300 kHz therapeutic ultrasound in acute cerebral vessel occlusion had to be stopped prematurely due to massive side effects attributable to ultrasound treatment (Daffertshofer et al. 2005). Atypical intracranial hemorrhage had occurred at sites distant from ischemia, with subarachnoid and intraventricular hemorrhage, and parenchymal hemorrhage into nonischemic cerebral tissue. Those clinical findings are very similar to the type of experimentally derived hemorrhage detected in our study and stress the importance of preclinical evaluation of this new therapeutic strategy.

The results of our study are also in line with experimental results on therapeutic ultrasound in the low frequency range (Daffertshofer et al. 2005; Schneider et al. 2006; Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007). In previous studies on effects of 20 kHz transcranial ultrasound, we had shown that ultrasound related side effects occur in a dose dependent fashion and that side effects are more likely to occur in animals subjected to brain ischemia, compared with animals without ischemic lesions (Schneider et al. 2006; Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007). These findings are corroborated by this study employing 60 kHz ultrasound.

One main observation was a significant difference in lesion volume between ultrasound treated and control animals, disfavoring ultrasound treated animals. However, this difference was only found in the groups subjected to temporary MCAO. Permanent occlusion resulted in comparable lesion volumes among treated and sham treated animals. This suggests an additional damaging effect of ultrasound on the ischemic, yet still viable brain tissue. It is well known from clinical and experimental studies that functionally and structurally compromised, yet still viable ischemic tissue, is more vulnerable to different pathophysiological and physical influences (Toni et al. 1994; Hajat et al. 2000; Capes et al. 2001). The exact mechanism that may lead to a harmful effect of ultrasound on ischemic brain tissue can not be derived from our data.

As perfusion, an effective measure of temperature regulation, is impaired in ischemic brain tissue, an ultrasound induced temperature elevation is discussed even for diagnostic applications of ultrasound (Nakagawa et al. 2007). Different studies on temperature effects of therapeutic transcranial ultrasound applications have not demonstrated clinically relevant increases in the brain temperature of rats (Fatar et al. 2006; Schneider et al. 2006). However, these studies were either performed on

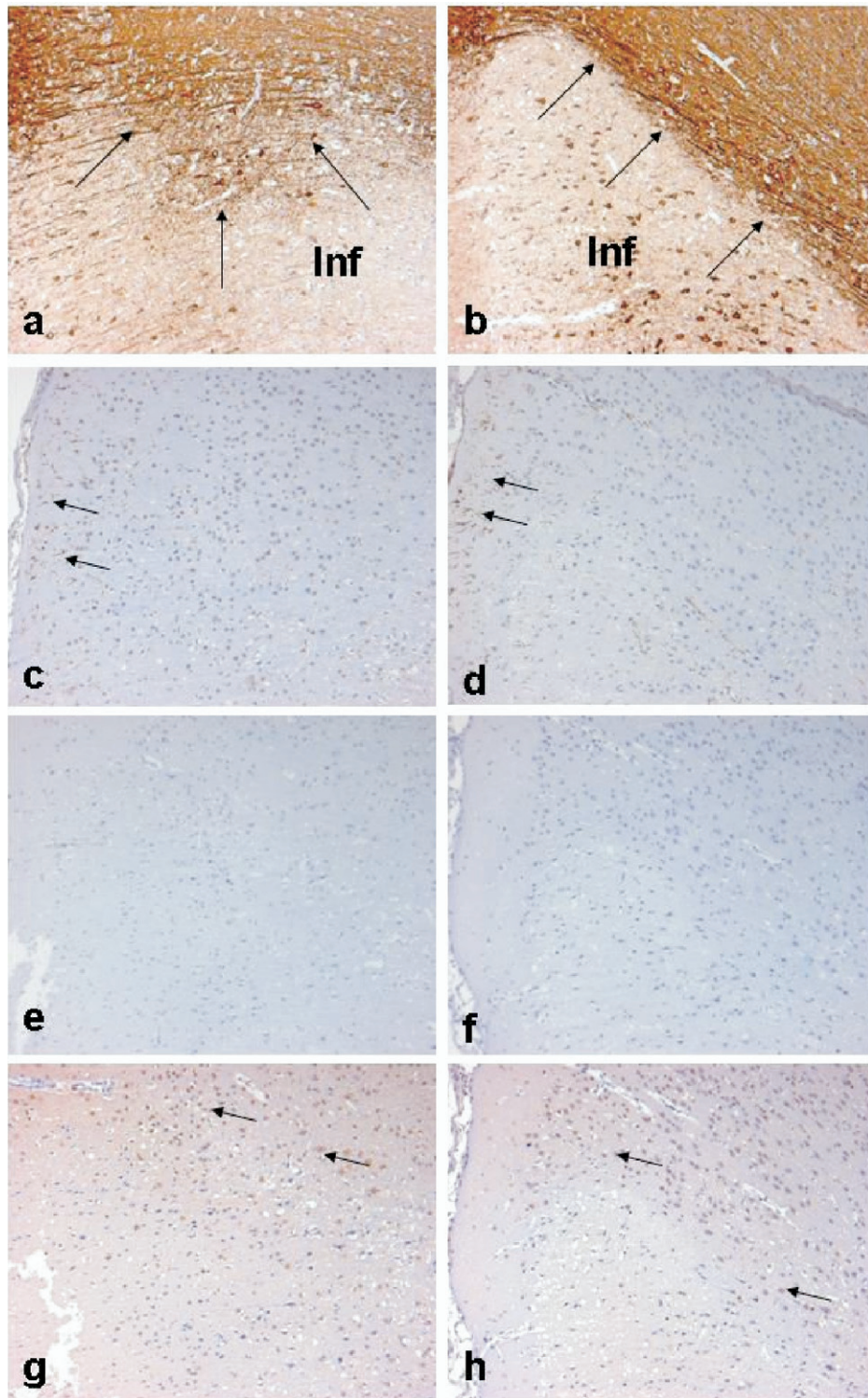


Fig. 3. Representative immunohistochemical stainings from ultrasound treated (left) and control (right) rats. MAP2 immunostaining, (a) and (b), clearly indicates the border (arrows) between the infarct (Inf) and the adjacent peri-infarct tissue. GFAP immunostaining, (c) and (d), reveals some scattered immunoreactive astrocytes at the surface of the cortex (arrows). Analysis with an antibody against the macrophage/microglia associated CD68 antigen, (e) and (f), fails to detect any labeled cells. Nuclear immunoreactivity for the transcription factor c-fos, (g) and (h), is detectable in scattered neuronal cells in the peri-infarct region (arrows). Note that there are no differences in the immunostaining pattern between the two experimental groups (magnification $\times 100$).

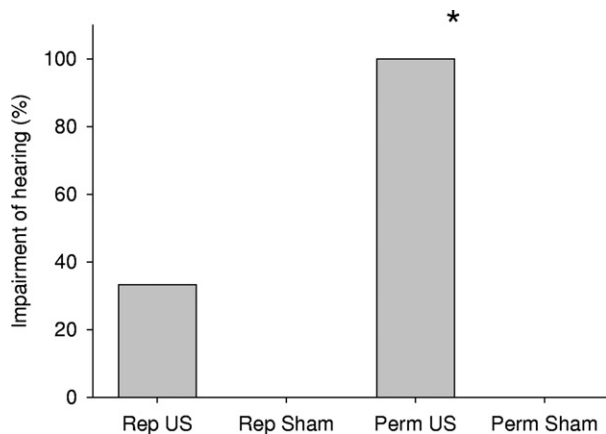


Fig. 4. Testing of hearing functions reveals impairment in a significant number of animals after transcranial treatment with ultrasound. Rep = Reperfusion after 90 min occlusion of MCA; Perm = Permanent occlusion of MCA; US: Ultrasound. * $p < 0.0001$ compared with sham insonation

healthy brain tissue (Fatar et al. 2006 mean temperature change $<1^{\circ}\text{C}$ at 340 kHz and an intensity of up to 7 W/cm^2), or made use of a more global brain temperature evaluation (Schneider et al. 2006 $<1^{\circ}\text{C}$ at 20 kHz and an intensity of up to 1.1 W/cm^2). In this study, an intermittent insonation scheme was used (Fig. 5). Evidence was found that more pronounced temperature effects within the ischemic territory are efficiently avoided by discontinuous use of ultrasound, making temperature effects unlikely to be the cause of the observed harmful effects. This should be taken into account in the planning of future studies on therapeutic ultrasound.

On the other hand, different effects as a consequence of the applied mechanical energy are conceivable, including damage due to the formation of ultrasound cavitations or the formation of free radicals (Fowlkes and Holland 2000). Further studies focusing on these mechanisms are needed in order to deepen the understanding of ultrasound induced adverse effects and in order to develop effective and safe therapeutic strategies.

Furthermore, this is the first study reporting harmful effects of ultrasound on auditory structures. Impaired hearing abilities were found in 57% of animals exposed to ultrasound, whereas all control animals showed normal responses to acoustic stimuli. This side effect is a specific concern in low frequency transcranial ultrasound application, as low frequency ultrasound propagates in a very wide sound beam, thus, potentially exposing the inner ear. Histology and MRI did not reveal structural damage in the brain stem or bilaterally in the temporal lobe region, making a central cause of impaired hearing less likely. The acoustical nerve is not directly visible on MRI. However, ADC and T2RT mapping of the trigem-

inal nerve, in analogy, did not reveal any abnormalities in group comparison. This is suggestive of a direct damaging effect on inner ear structures. The inner ear may be vulnerable to ultrasound due to its close contact to bone, as the bone/soft-tissue interface is particularly prone to ultrasound induced heating (Myers 2004).

Apart from the above adverse effects, immunohistochemical staining did not reveal any specific damaging influences of ultrasound on astro- and microglial or neuronal structures.

Our study, in conclusion, gives further evidence of the deleterious effects of therapeutic transcranial ultrasound in the very low frequency range. The applied intensities were low (acoustic intensity 0.14 W/cm^2). In conjunction with our results on 20 kHz ultrasound (Wilhelm-Schwenkmezger et al. 2007), this suggests that there is little scope left for further development of very low frequency ultrasound towards a clinically applicable therapeutic measure. However, it is stressed that our results are to be seen in the context of the parameter settings chosen in this study as well as the chosen animal model. Validation of different parameters, such as another pulsation, duty cycle and time of exposure to ultrasound is still of importance to clarify the impact of these parameters on the occurrence of therapeutic and side effects (Meunier et al. 2007).

Also, strategies to avoid the formation of standing waves should be included into evaluation (Connor and Hynynen 2004). In our animal model, constructive interference effects could have occurred, depending on the relative size of the wavelength (2.56 cm) and the rat skull

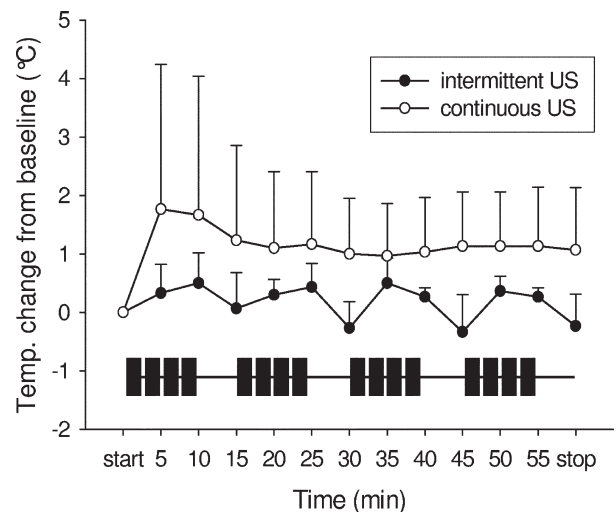


Fig. 5. Intracerebral temperature changes from baseline during 1 h intermittent and 1 hr continuous transcranial insonation. Intermittent insonation resulted in only mild temperature elevation with all values below 1°C . The black bars indicate the periods of insonation of the intermittent scheme, with repeated 30 sec and 5 min pauses. US = Ultrasound.

(average width x height: 1.52 x 1.01 cm). Application in larger volumes such as the human skull may possibly result in formation of standing waves, thereby promoting areas of high intensity and possibly leading to thermal influence on tissue boundary layers as well as tissue damage by cavitation effects. Most importantly, the results are not transferable to other, higher frequencies in the kHz frequency range (Gerriets *et al.* 2007). The ultrasound frequency most suitable for therapeutic purposes still has to be established.

In general, the set-up chosen in our study does not permit a direct transfer of our results into the human setting. Due to the different anatomy and larger volume of the human skull and brain, sound field characteristics, ultrasound exposures and specific bioeffects will be different from the ones observed in this study. Our data and the results of the clinical TRUMBI trial (Daffertshofer *et al.* 2005) emphasize that further evaluation of therapeutic transcranial ultrasound has to take side effects into the focus of consideration. Careful experimental evaluation in animal models is a prerequisite before the promising technique of low frequency therapeutic ultrasound can be re-introduced into clinical evaluation.

Acknowledgments—This work was supported by a grant of the German Federal Ministry of Economics and Technology (PRO INNO II, KF0118601DA5) and by a local research grant (MAIFOR). The authors are grateful for expert technical assistance from Anett Ehlert and Michael Malzahn.

REFERENCES

- Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moye LA, Hill MD, Wojner AW. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2004;351:2170–2178.
- Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: Diagnostic versus therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2001; 27:1683–1689.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: A systematic overview. *Stroke* 2001;32:2426–2432.
- Connor CW, Hynynen K. Patterns of thermal deposition in the skull during transcranial focused ultrasound surgery. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51:1693–1706.
- Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzer M, Sliwka U, Els T, Sedlaczek O, Koroshetz WJ, Hennerici MG. Transcranial low frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia: Increased risk of hemorrhage with combined ultrasound and tissue plasminogen activator: Results of a phase II clinical trial. *Stroke* 2005;36:1441–1446.
- Eggers J, Seidel G, Koch B, König IR. Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA. *Neurology* 2005; 64:1052–1054.
- Eggers J, Koch B, Meyer K, König I, Seidel G. Effect of ultrasound on thrombolysis of middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 2003; 53:797–800.
- Fatar M, Stroick M, Griebel M, Alonso A, Hennerici MG, Daffertshofer M. Brain temperature during 340-kHz pulsed ultrasound insonation: A safety study for sonothrombolysis. *Stroke* 2006;37: 1883–1887.
- Fowlkes JB, Holland CK. Mechanical bioeffects from diagnostic ultrasound: AIUM consensus statements. *American Institute of Ultrasound in Medicine. J Ultrasound Med* 2000;19:69–72.
- Gerriets T, Walberer M, Nedelmann M, Bachmann G, Kaps M. Blood-brain barrier disruption by low frequency ultrasound. *Stroke* 2007; 38:251.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* 2004a;35:566–571.
- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: Investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004b;12:137–143.
- 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.
- Ishibashi T, Akiyama M, Onoue H, Abe T, Furuhashi H. Can transcranial ultrasonication increase recanalization flow with tissue plasminogen activator? *Stroke* 2002;33:1399–1404.
- Meunier JM, Holland CK, Lindsell CJ, Shaw, GJ. Duty cycle dependence of ultrasound enhanced thrombolysis in a human clot model. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:576–583.
- Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Arenillas JF, Huertas R, Purroy F, Delgado P, Alvarez-Sabin J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke* 2006;37: 425–429.
- Myers MR. Transient temperature rise due to ultrasound absorption at a bone/soft-tissue interface. *J Acoust Soc Am* 2004;115:2887–2891.
- Nakagawa K, Ishibashi T, Matsushima M, Tanifuji Y, Amaki Y, Furuhashi H. Does long-term continuous transcranial Doppler-monitoring require a pause for safer use? *Cerebrovasc Dis* 2007;24: 27–34.
- Nedelmann M, Brandt C, Schneider F, Eicke BM, Kempfski O, Krummenauer F, Dieterich M. Ultrasound-induced blood clot dissolution without a thrombolytic drug is more effective with lower frequencies. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:18–22.
- Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, Heimann A, Fuchshagen F, Eicke BM, Dieterich M, Kempfski O. Cerebral embolic ischemia in rats: Correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain Res* 2007;1130:188–196.
- Reinhard M, Hetzel A, Krüger S, Kretzer S, Talazko J, Ziyeh S, Weber J, Els T. Blood-brain barrier disruption by low frequency ultrasound. *Stroke* 2006;37:1546–1548.
- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 1998;29:2162–2170.
- Schneider F, Gerriets T, Walberer M, Müller C, Rolke R, Eicke BM, Bohl J, Kempfski O, Kaps M, Bachmann G, Dieterich M, Nedelmann M. Brain edema and intracerebral necrosis caused by transcranial low frequency 20-kHz ultrasound: A safety study in rats. *Stroke* 2006;37:1301–1306.
- Suchkova V, Carstensen EL, Francis CW. Ultrasound enhancement of fibrinolysis at frequencies of 27 to 100 kHz. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:377–382.
- Toni D, De Michele M, Fiorelli M, Bastianello S, Camerlingo M, Sacchetti ML, Argentino C, Fieschi C. Influence of hyperglycaemia on infarct size and clinical outcome of acute ischemic stroke patients with intracranial arterial occlusion. *J Neurol Sci* 1994;123: 129–133.
- Wilhelm-Schwenkmezger T, Pittermann P, Zajonz K, Kempfski O, Dieterich M, Nedelmann M. Therapeutic application of 20 kHz transcranial ultrasound in an embolic middle cerebral artery occlusion model in rats: Safety concerns. *Stroke* 2007;38:1031–1035.

LOW-FREQUENCY ULTRASOUND (60 KHZ) WITH VARIED DUTY CYCLE: EFFECTS ON ISCHEMIC BRAIN TISSUE AND THE INNER EAR

P. Reuter¹, J. Masomi¹, H. Kuntze¹, I. Fischer², A.-O. Viertmann¹, J. Marx¹, K. Helling², C. Sommer³, B. Alessandri⁴, O. Kempfski⁴, M. Nedelmann⁵

¹Neurology, ²Department of Otolaryngology, ³Neuropathology, ⁴Institute of Neurosurgical Pathophysiology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, ⁵Neurology, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

Background and aims: The thrombolytic activity of ultrasound, but also the safety of ultrasound thrombolysis depends on variation of technical ultrasound parameters. In a recent in vitro study, a longer duration of the duty cycle [relationship of the on-phase to the total duration of an ultrasound pulse] was shown to improve thrombolytic efficacy of ultrasound (Meunier et al., 2007). The aim of our study was to examine the effect of different duty cycle settings in vivo on brain tissue after occlusion of the middle cerebral artery.

Methods: To investigate the effects of 60 kHz pulsed ultrasound, rats were transcranially treated following reperfusion of the middle cerebral artery (90 minutes after induction of ischemia by use of the suture model). The duty cycle was set at 20% and 80%, while keeping time average intensity constant. Analysis included measurement of infarct volume (TTC-staining) and functional-neurological evaluation. An additional group of healthy animals was insonated with the same ultrasound setup, and acoustically evoked potentials were measured to examine side effects on the auditory system.

Results: Ultrasound at short duty cycle setting resulted in a significant increase of the ischemic lesion volume compared to control animals. This negative side effect could not be detected in prolonged on-phase pulsation (resulting in reduction of energy spikes within the pulse). Furthermore, insonation resulted in a reduction of auditory function (reduction of the auditory threshold level up to 40 dB).

Conclusions: The results demonstrate that longer duty cycles not only positively influence the therapeutic effects but are also beneficial with regard to safety issues. The findings may serve as a basis for future developments of prototype therapeutic ultrasound devices. The study is first to describe side effects on the auditory system, which may further limit clinical utility of low frequency ultrasound in therapeutic applications. Further histological investigation of the tissue (brain and auditory system) may give more insight into the nature of the observed side effects.

References: J. M. Meunier C. K. Holland, C. J. Lindsell, and G. J. Shaw. Duty cycle dependence of ultrasound enhanced thrombolysis in a human clot model *Ultrasound Med Biol.* 2007 April; 33(4): 576-583.

Brain Poster Session: Stem Cells & Gene Therapy**GENE EXPRESSION IN THE BRAIN AFTER INSONATION WITH ULTRASOUND: A COMPARISON BETWEEN EXPERIMENTAL AND DIAGNOSTIC ULTRASOUND PROBES**

P. Reuter¹, A. Fabrizius², M. Nedelmann³, J. Marx¹, B. Alessandri⁴, O. Kempfski⁴, T. Hankeln²

¹Neurology, ²Molecular Genetics, Johannes Gutenberg-University, Mainz, ³Neurology, Justus-Liebig University, Giessen, ⁴Institute of Neurosurgical Pathophysiology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Background and aims: Latest experimental and clinical studies could show that the use of diagnostic ultrasound (3 MHz) in addition to rtPA treatment successfully enhances thrombolysis cerebral vessel occlusion. However, a potential effect on gene expression is unknown, but should be considered for safety reasons.

The aim of this study was to examine the effects of ultrasound treatment on cerebral gene expression. For this purpose, three ultrasound probes of different frequencies (3 MHz diagnostic probe; 60 and 488 kHz experimental probes) were compared.

Methods: The brain of healthy rats was transcranially insonated with the above probes. For measuring the gene expression we extracted RNA of the cerebral cortex and transcribed the RNA into cDNA. After normalization to reference genes (GAPDH, actin, cyclophilin A, ARP and albumin) we measured expression of several candidate genes from different functional groups (major focus: apoptosis, angiogenesis, NO-metabolism, stress). Gene expression levels were determined by quantitative Real-Time RT-PCR (qPCR) assays.

Results: The measurement of mRNA-expression of selected genes with qPCR showed significant differences between insonated and non-insonated animals. As one example, insonation with the diagnostic ultrasound probe induced a doubled increase of gene expression of the pro-apoptotic gene bcl-2. Most of the regulations were detected after insonation with 488kHz ultrasound. We found an up to 3-fold change after 4 or 24 hours for 14 of the 24 studied genes compared to sham-insonated animals. Angiogenesis factors (Vegfa, Egfr, Egr1) showed a decreased expression. Fewest regulations were detected after insonation with the 60 kHz ultrasound probe (3 of 24 measured genes).

Conclusions: The results of this study indicate that not only histological changes can be observed after ultrasound treatment, but also changes of gene expression are detectable. Most of the changes were found after treatment with 488 kHz ultrasound. Further studies have to identify whether these changes have a positive or negative effect on the ischemic lesion. Additionally these findings give reasons to a global gene expression study.

11 Digitaler Anhang