

Aus der Klinik für Neurologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Münte

Entwicklung eines computergesteuerten, pulsatilen
Flussmodells zur Simulation und Untersuchung der
Wirkmechanismen der Sonothrombolyse

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Florian C. Roessler
aus Hechingen

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günter Seidel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Gehring

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.06.2012

Für Eva und Levin

*An manchen Tagen sehe ich klar
was ich sein kann
was ich war
was ich jetzt tu und wie viel
es mir wirklich bringen mag.*

Philipp Taraz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Grundlagen und Motivation	9
2.1. Sonothrombolyse	11
2.1.1. Wichtige klinische Studien	12
2.1.2. Thrombolytische Wirkung des Ultraschalls	13
2.1.3. Risiken der Sonothrombolyse	13
2.2. Modellbildung in der Sonothrombolyseforschung	14
2.2.1. Thrombusmodelle	16
2.3. Ziel der vorliegenden Arbeit	17
3. Material und Methoden: Das Lübecker Flussmodell	19
3.1. Computergesteuerte Exzentrerschneckenpumpe	21
3.2. Laufzeitdifferenzmesser	24
3.3. Thrombuskorb	26
3.4. Drucksensoren	30
3.5. Widerstands- und Überdruckventile	31
3.6. Bestandteile des Blutersatzflüssigkeitskreislaufs	32
3.6.1. Schlauchsystem	32
3.6.2. Blasenfänger	32
3.6.3. Reservoir	33
3.6.4. Wasserbecken	34
3.7. Temperatur- und pH-Wert-Regulierung	35
3.8. Ultraschallgerät	35

3.9. Datenerfassung	36
3.9.1. Aufzeichnung der Druckwerte	36
3.9.2. Aufzeichnung der Flussgeschwindigkeitswerte	37
3.10. Thrombusgenerierung	38
4. Experimentelle Analyse des Messtandes	45
4.1. Untersuchungen zur generierten Flussgeschwindigkeit	45
4.2. Untersuchungen zur Druckmessung	48
4.3. Hydrodynamische Beschreibung des Thrombuskorbes	52
4.4. Generierung physiologischer Flussverhältnisse	56
4.5. Messungen zur Ultraschalltransmission	59
4.6. Erfassung und Nachverarbeitung der Druckwerte	60
4.6.1. Samplingrate und Mittelung der Daten	60
4.6.2. Driftbereinigung	62
4.6.3. Normierung	63
4.6.4. Umrechnungskurven	66
4.7. Validierung des Thrombusmodells	69
4.7.1. Untersuchungen zur Stabilität der Thromben	71
4.7.2. Histologische Untersuchung der Thromben	72
4.8. Qualitative Validierung des Messverfahrens	74
5. Der erste Sonothrombolyseversuch	77
6. Diskussion	83
7. Zusammenfassung	89
A. Anhang	99
B. Danksagung	103
C. Lebenslauf	105

1. Einleitung

Die schnelle und wirkungsvolle Behandlung des Hirninfarkts ist von großer sozio-ökonomischer Bedeutung und entscheidend für das persönliche Schicksal des Betroffenen. Seit rund 10 Jahren werden verstärkte Anstrengungen zur Etablierung der Sonothrombolyse, d.h. der transkraniellen Beschallung akut verschlossener, intrakranieller Arterien unternommen. Die potentiellen Einsatzmöglichkeiten der Sonothrombolyse sind enorm, da sie schnell, nichtinvasiv und preisgünstig die Rekanalisationszeit verkürzen und gleichzeitig die Rekanalisationsrate verschlossener Gefäße erhöhen kann. Die Erfahrungen, die bisher *in vitro*, im Tiermodell und auch in klinischen Studien gewonnen wurden, sind vielversprechend. Welche Ultraschallfrequenzen und akustischen Energien sowohl unter Effektivitäts- als auch unter Sicherheitsaspekten optimal sind, konnte allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Entwicklung eines *in vitro* Modells, das, im Gegensatz zu allen bislang publizierten Modellen, die Parameter der Sonothrombolyse unter physiologischen Strömungsverhältnissen einer systematischen und reproduzierbaren Erforschung zugänglich machen kann. Die Datenerfassung soll kontinuierlich und bezüglich des untersuchten Thrombus kontaktfrei erfolgen, um den dynamischen Prozess der Thrombolyse zeitlich aufzulösen und gleichzeitig störungsfrei analysieren zu können. Die so gewonnenen Ergebnisse sollen zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise der Sonothrombolyse beitragen und das Fundament weiterführender Patientenstudien sein, deren Ziel wiederum die Etablierung der Sonothrombolyse als wirkungsvolle und sichere Therapieform bei akuten Hirnarterienverschlüssen ist.

Bereits jetzt spielt der transkranielle Ultraschall in der frühen Diagnostik des Hirninfarkts eine wesentliche Rolle. Aus der Möglichkeit, dieselben physikalischen Mechanismen und Geräte auch therapeutisch zu nutzen, erwächst ein großes klinisches und gesundheitsökonomisches Potential.

Für die Modellentwicklung erhielt der Autor den Forschungspreis 2008 der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (E05-2008) sowie den Förderpreis 2008 der Sektion Neurologie der Deutschen Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM). Das Modell und die Versuchsergebnisse wurden auf nationalen und internationalen Kongressen, u.a. im Mai 2009 auf der XVIII. European Stroke Conference in Stockholm, vorgestellt und publiziert (vgl. S. 107).

Gliederung

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Realisierung eines vollkommen neuen Versuchsstands. Die Beschreibung des Aufbaus, der Analyse und der abschließenden Testung des entwickelten Modells ließ sich nicht in den allgemein üblichen Methoden-, Versuchs- und Ergebnisteil gliedern. Zur besseren Strukturierung wurde daher ein anderer Aufbau gewählt:

Kapitel 2 liefert einen fundierten Einblick in die Hintergründe der vorliegenden Arbeit. Dazu wird der aktuelle Stand der Wissenschaft auf dem Gebiet der Sonothrombolyse zusammengefasst und daraus die Motivation der Arbeit entwickelt.

Im Kapitel 3 werden Aufbau und Prinzip des Modells vorgestellt und die technischen und physikalischen Einzelheiten des Versuchsstands detailliert erläutert.

Das Kapitel 4 widmet sich der Analyse des Modells. Anhand von Experimenten werden die einzelnen Bauteile des Modells hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Genauigkeit überprüft. Auch die Datenerfassung und -nachverarbeitung werden hier kritisch beleuchtet. Um einer Verkomplizierung der Sachverhalte vorzubeugen, werden die Ergebnisse der dazu durchgeführten Versuche anschließend direkt diskutiert.

Inhalt des Kapitels 5 ist der erste Sonothrombolyseversuch, der mit dem Modell durchgeführt wurde. Er soll die Funktionstüchtigkeit des Modells demonstrieren.

Schließlich werden in Kapitel 6 die Stärken und Schwächen des entwickelten Modells zusammengefasst und besprochen. Auch die Ergebnisse des Sonothrombolyseversuchs werden hier noch einmal kritisch hinterfragt. Für bislang offene Probleme werden Lösungsansätze vorgestellt.

Jedes Kapitel schließt mit einer kurzen Zusammenfassung seiner wichtigsten Inhalte.

2. Grundlagen und Motivation

Thrombembolisch oder atherothrombotisch ausgelöste Hirninfarkte sind häufige Erkrankungen, die zu schwerwiegenden neurologischen Ausfällen führen und langfristig gravierende Einschränkungen in privater wie auch beruflicher Hinsicht mit sich bringen können. In Deutschland ist der Schlaganfall die Erkrankung mit der höchsten Rate bleibender Behinderung [19]. Aus gesundheitsökonomischer Sicht entstehen durch die Pflege- und Rehabilitationsbedürftigkeit vieler Patienten enorme Kosten [32]. Eine Optimierung der bestehenden therapeutischen Verfahren ist daher zwingend notwendig. Direkt nach dem Verschluss einer Hirnarterie ist das Areal der irreversibel untergegangenen Nervenzellen klein im Vergleich zu dem Gebiet der Zellen, die zwar funktionell beeinträchtigt sind, aber noch einen erhaltenen Stoffwechsel aufweisen. Dieser reversibel geschädigte Zellverband wird Penumbra genannt. Eine zunehmende Zellschädigung im Bereich der Penumbra hängt vom Ausmaß und von der Dauer der bestehenden Hypoperfusion ab. Bei der akuten Schlaganfalltherapie ist deshalb die frühzeitige Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes von größter Bedeutung, da so Hirngewebe gerettet und ein verbessertes Outcome des Patienten erreicht werden kann [3, 50].

Die Rate frühzeitiger spontaner Rekanalisationen von thrombotisch verschlossenen Hirngefäßen ist gering. Nach einer Studie von Molina et al. kommt es bei Verschlüssen der A. cerebri media (MCA) lediglich in 18.8 % der Fälle zu einer spontanen Wiedereröffnung des Gefäßes binnen 6 Stunden [39].

Die systemische Thrombolyse mit rt-PA (rekombinanter Gewebs-Plasminogen-Aktiva- tor, syn. Alteplase) ist die einzige bislang zugelassene Therapieform und erhöht die Rekanalisationsrate deutlich. In einer von Rha et al. veröffentlichten Metaanalyse, in der Daten von 53 Studien mit insgesamt 2066 Patienten zusammengefasst wurden, beträgt die Rate aller kompletten und inkompletten Rekanalisationen binnen 24 Stun-

den nach Auftreten der Symptomatik bei Patienten, die einer systemischen Thrombolyse mit rt-PA unterzogen wurden, 46.2 % im Vergleich zu lediglich 24.1 % bei den Spontanverläufen [50]. Gleichzeitig belegt diese Studie, dass eine Verbesserung des langfristigen klinischen Outcomes mit einer zunehmenden Rekanalisationsdauer immer unwahrscheinlicher wird. Am deutlichsten profitieren diejenigen Patienten, bei denen eine Gefäßwiedereröffnung binnen 6 Stunden gelingt. Aus diesem Grund sind Rekanalisationszeit von bis zu 24 Stunden unter einer intravenösen Thrombolyse immer noch zu lang. Darüber hinaus bleibt trotz dieses Verfahrens ein Teil der betroffenen intrakraniellen Arterien dauerhaft verschlossen [41]. Eine Effizienzsteigerung der herkömmlichen systemischen Thrombolyse ist daher dringend erforderlich. Abgesehen davon beinhaltet die medikamenteninduzierte Thrombolyse das Risiko systemischer Blutungen. Aus diesem Grund muss vor der Anwendung dieser Therapieform eine Vielzahl strenger Ein- und Ausschlusskriterien berücksichtigt und überprüft werden [27, 61]. So dürfen beispielsweise Patienten mit einer malignen Grunderkrankung, einem kürzlich durchgeführten chirurgischen Eingriff, einer Gerinnungsstörung oder einer bestehenden Antikoagulation nicht systemisch lysiert werden. Eine weitere Limitation ergibt sich aus dem zeitlichen Abstand zwischen dem erstmaligen Auftreten der Symptomatik und dem möglichen Therapiebeginn. Sofern zum Nachweis einer zerebralen Ischämie als bildgebendes Verfahren lediglich eine kraniale Computertomographie zur Verfügung steht, sollte die systemische Lyse nur in einem Zeitfenster von 4.5 Stunden durchgeführt werden [27]. Wird dieser zeitliche Rahmen überschritten, steigt das Risiko intrakranieller Blutungen deutlich an.

Im Jahr 2010 konnten aufgrund dieser Einschränkungen in der Klinik für Neurologie am Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) nur 10.7 % der binnen 24 Stunden eingewiesenen ischämischen Schlaganfallpatienten systemisch lysiert werden. Innerhalb der Grenzen Norwegens, der Schweiz und der Europäischen Union (ausgenommen Malta und Zypern) lag die Quote der systemisch lysierten Schlaganfallpatienten im Jahr 2005 sogar bei nur 3.3 % [36] und in den USA zwischen 2005 und 2007 bei lediglich 2.4 % [33].

2.1. Sonothrombolyse

Die lokale transkranielle Anwendung von Ultraschall mittels Doppler- oder Farbduplexgeräten (TCD bzw. TCCS) zur Wiedereröffnung akut thrombotisch verschlossener intrakranieller Hirngefäße, kurz Sonothrombolyse, hat dagegen keine systemischen Nebenwirkungen und lässt sich daher bei einem deutlich größeren Patientenkollektiv einsetzen. Als einzige Voraussetzung ist hierbei der sonographische Nachweis eines proximal gelegenen, intrakraniellen Hirnarterienverschlusses zu erbringen. Nach eigenen, unveröffentlichten Schätzungen, liegt der Anteil derjenigen Patienten, die für eine Ultraschalltherapie in Frage kommen, bei ca. 25 %. Damit könnten am UKSH in Lübeck mehr als doppelt so viele Patienten als bisher von einer verbesserten Akutbehandlung ihrer embolisch bedingten, zerebralen Ischämien profitieren. Für die systemisch lysierbaren Patienten könnte der zusätzliche Einsatz von Ultraschall zu einer weiteren Optimierung der Behandlung führen.

Die klinische Anwendung der Sonothrombolyse wurde im Jahr 2000 durch Alexandrov et al. [4] angestoßen. Er fand bei rt-PA-behandelten Hirninfarktpatienten, bei denen die Rekanalisation der A. cerebri media kontinuierlich mittels herkömmlicher diagnostischer transkranieller Dopplersonographie (2 MHz, 128 mW/cm²) überwacht wurde, eine Rekanalisation in 70 % der Fälle sowie eine deutliche klinische Besserung innerhalb von 24 Stunden, so dass ein zusätzlicher therapeutischer Effekt durch die Ultraschallanwendung postuliert wurde. Bereits 1976 hatten Trübestein et al. [63] die signifikante Beschleunigung der rt-PA-induzierten Thrombolyse unter der Wirkung von Ultraschall im Rahmen von *in vitro* Experimenten nachgewiesen. Seit den 1990er Jahren waren weitere experimentelle Studien durchgeführt worden, die zeigten, dass schon die alleinige Anwendung von Ultraschall in einem weiten Frequenzspektrum (20 kHz bis 2 MHz) und einer Schallintensität von 120 - 4000 mW/cm² eine thrombolysierende Wirkung hat [10, 18, 43]. In anderen Experimenten fand sich erst dann eine erhöhte lysierende Wirkung des Ultraschalls, wenn der Ultraschall gemeinsam mit einem Thrombolytikum, wie dem rt-PA, eingesetzt wurde [6, 23]. Zu einer noch effektiveren Thrombolyse kommt es bei gleichzeitiger Verwendung von Ultraschall, Thrombolytikum und Echo-signalverstärkern, die aus gasgefüllten Mikrobläschen bestehen [11, 40, 44].

2.1.1. Wichtige klinische Studien

Die bislang größte prospektiv-randomisierte Folgestudie ist die CLOTBUST-Studie [5]. Bei dieser einfach geblindeten, multizentrischen Studie ($n = 126$) wurde der Effekt einer zweistündigen, transtemporalen Ultraschallapplikation mit einem handelsüblichen, diagnostischen Dopplergerät (TCD: 2 MHz, 750 mW/cm^2) während bzw. nach einstündiger intravenöser Gabe von rt-PA bei akuten MCA-Verschlüssen untersucht. In der Kontrollgruppe wurden die Patienten nur mit rt-PA behandelt. In der Ultraschallgruppe fand sich eine signifikant höhere Patientenzahl mit einer kompletten Rekanalisation oder drastischen klinischen Verbesserung innerhalb von zwei Stunden (49 % vs. 30 %). Nach 3 Monaten wiesen 42 % der beschallten Patienten ein gutes klinisches Outcome (mRS 0-1) auf. In der Kontrollgruppe lag die Rate bei lediglich 29 %.

Kleinere monozentrische Studien von Eggers et al. zeigten, dass die transkranielle Farbduplexsonographie (TCCS: 1.8 MHz, 179 mW/cm^2) sowohl mit als auch ohne systemische rt-PA-Applikation zu einer signifikant höheren Rekanalisationsrate führt [18, 17]. Während sich das langfristige Outcome (mRS nach 90 Tagen) bei alleiniger Ultraschallbehandlung nur tendenziell besserte, kam es zu einer signifikanten Verbesserung des Outcomes (Barthel Index nach 90 Tagen) bei der kombinierten Behandlung mit rt-PA. Da sich bei niedrigen Sendefrequenzen die Abschwächung der Ultraschallintensität beim Durchtritt durch den knöchernen Schädel verringert, bestand die Hoffnung, durch eine Senkung der Frequenz die thrombolytische Potenz des Ultraschalls weiter steigern zu können. In der dazu initiierten TRUMBI-Studie wurde therapeutischer 300-kHz-Ultraschall (700 mW/cm^2) 90 Minuten lang bei Patienten appliziert, die innerhalb eines 6-Stunden-Zeitfensters mit rt-PA lysiert wurden [12]. Die Studie musste jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da es im Vergleich zur Monotherapie mit rt-PA zu einer stark erhöhten Rate intrakranieller Blutungen kam.

Die erste klinische Studie zur kombinierten Anwendung von Ultraschall und Echo-signalverstärkern wurde 2006 von Molina et al. veröffentlicht [40]. Es fand sich eine signifikant erhöhte Rate kompletter Rekanalisation sowie eine signifikant verkürzte Rekanalisationszeit bei Patienten, die mit rt-PA, 2-MHz-TCD-Ultraschall und Mikrobläschen (Levovist[®]) behandelt wurden, verglichen mit Patienten, die lediglich einer Behandlung mit rt-PA und Ultraschall unterzogen worden waren. Ähnliche Ergeb-

nisse lieferte eine von Perren et al. durchgeführte Studie, bei der zur transkraniellen Beschallung ein Farbduplexgerät (TCCS: 2 MHz, 189 mW/cm²) verwendet und als Echosignalverstärker SonoVue[©] eingesetzt wurde [48].

2.1.2. Thrombolytische Wirkung des Ultraschalls

Die bislang durchgeführten Experimente und Studien belegen zwar den thrombolytischen Effekt des Ultraschalls, ein klares Verständnis des Wirkmechanismus besteht dagegen noch nicht. Vermutlich ist Ultraschall in der Lage, die Fibrinstruktur des Thrombus zu lockern. Ob diese Einwirkungen mit dem Effekt der Stoßwellenlithotripsie zu vergleichen sind oder eher den Ausgangspunkt für eine verstärkte Autolyse bilden, ist unklar. Da Ultraschall besonders signifikant die Wirkung thrombolytischer Substanzen steigert, werden jedoch vornehmlich reversible Veränderungen der Fibrinstruktur durch eine Deaggregation noch nicht vernetzter Fibrinfasern und eine kavitationsbedingte Veränderung der Thrombusstruktur als wahrscheinlichste bzw. stärkste Wirkmechanismen diskutiert [9, 21, 55]. Durch sie entsteht vermutlich eine verbesserte Penetrations- und Bindungsmöglichkeit des Thrombolytikums [21, 20, 56], was zu einer Verstärkung der enzymatischen Fibrinolyse und gleichzeitig zu einer Vergrößerung der Lysezone führen könnte [21, 55, 58]. Thermische Effekte scheinen dagegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [8, 22, 60].

Bei der gleichzeitigen Anwendung von Ultraschall und Echosignalverstärkern dienen die Mikrobläschen als Kavitationsnuklei. In Abhängigkeit von der eingestellten Ultraschallfrequenz und der Schallenergie können sie zum Schwingen oder sogar zum Platzen gebracht werden [59], wodurch im Bereich des beschallten Thrombus Energie freigesetzt wird. Es kommt so zu einer verstärkten Auflockerung des Thrombus und zu einer gesteigerten Wirkung der Sonothrombolyse [13].

2.1.3. Risiken der Sonothrombolyse

Die Untersuchungen hinsichtlich der potentiellen Gefahren der Sonothrombolyse lassen ebenfalls noch keine eindeutigen Aussagen zu. Aufgrund der geringeren Reflexion niederfrequenter Schallwellen beim Eintritt in das Hirn ist grundsätzlich die Wirkung

und damit auch der potentiell schädliche Einfluss des Ultraschalls bei niedrigeren Frequenzen stärker ausgeprägt und korreliert darüber hinaus direkt mit der Schallenergie sowie der Insonationsdauer [7].

Für den diagnostischen transkraniellen Ultraschall (2 MHz) fanden sich in Patientenstudien weder bei der alleinigen Ultraschallapplikation (Intensität bis 530 mW/cm^2) [18, 66], noch bei einer zusätzlichen rt-PA-Behandlung (Schallintensität bis 750 mW/cm^2) [4, 5] Hinweise auf Schädigungen am Hirngewebe. Die bereits erwähnte TRUMBI-Studie lieferte dagegen den Hinweis dafür, dass die rt-PA-unterstützte Sonothrombolyse bei Frequenzen, die unterhalb des üblichen diagnostischen Spektrums liegen, risikoreich zu sein scheint. Als mögliche Ursachen der Blutungskomplikationen werden vasodilatierende Effekte und eine Störung der Blut-Hirn-Schranke diskutiert. Bei hohen Schallintensitäten (1600 mW/cm^2) kann Ultraschall selbst im 1-MHz-Bereich bereits nach 15 Minuten erste Entzündungsreaktionen an den Endothelzellen von Rindern auslösen [37]. Schließlich scheint auch der Einsatz von farbkodiertem, transkraniell Ultraschall (TCCS: 1.8 MHz, 179 mW/cm^2) in Kombination mit einer systemischen Lyse das Blutungsrisiko zu erhöhen, auch wenn das langfristige Outcome und die Mortalitätsrate dadurch nicht beeinflusst werden [17].

2.2. Modellbildung in der Sonothrombolyseforschung

Die Bedeutung der Sonothrombolyse als zukünftiges Therapieverfahren ist allgemein anerkannt. Der Wirkmechanismus der Sonothrombolyse ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Noch ist beispielsweise nicht klar, welche Frequenzen, Schallintensitäten und Insonationsdauern den größten therapeutischen Effekt erzielen können, ohne dass gleichzeitig ein Risiko für den Patienten entsteht. Auch wurde bislang nicht der Einfluss hämodynamischer Zustandsgrößen auf die Wirkung der Sonothrombolyse untersucht. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass ein Zusammenhang zwischen der Effektivität der Autolyse, rt-PA-vermittelter Thrombolyse und Sonothrombolyse einerseits und den Blutdruck- und Herzfrequenzwerten sowie den Flussgeschwindigkeiten in den basalen Hirnarterien des Patienten andererseits besteht. So fanden Tsivgoulis et al. ein inverses Abhängigkeitsverhältnis zwischen systolischem Blutdruck und der Rekanalisationsrate

beziehungsweise der klinischen Besserung von Patienten im Rahmen der systemischen Thrombolyse [64]. Die Kenntnis solcher Zusammenhänge ist von großer Bedeutung, da so bereits während der präklinischen Versorgung des Patienten wichtige Maßnahmen zur Verbesserung seiner Prognose eingeleitet werden könnten [25, 64]. Es erscheint daher zwingend notwendig, die Wirkungsweisen und Risiken der Sonothrombolyse in reproduzierbaren Experimenten systematisch unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Patientenstudien hätten dabei sicherlich die größte Aussagekraft, sind jedoch für die Grundlagenforschung aufgrund der potentiellen Risiken ethisch nicht zu vertreten. Hinzu kommt, dass die wesentlichen Variablen nicht gezielt veränderbar sind.

Tiermodelle haben den Vorteil, dass sie das komplexe Gerinnungssystem des Bluts berücksichtigen und gleichzeitig die Risiken einer Patientenstudie umgehen. Der Nachteil von Tiermodellen besteht in einem vergleichsweise hohen finanziellen wie auch zeitlichen Aufwand, da relevante Parameter nur sehr schwer systematisch verändert werden können. In Bezug auf die Schädelgeometrie und das Herzkreislaufsystem unterscheiden sich darüber hinaus die gängigen Versuchstiere, wie Ratten, Kaninchen und Hunde, deutlich vom Menschen. Ultraschallfrequenz und -intensität müssen daher auf diese veränderten Verhältnisse abgestimmt werden. Geschieht dies nicht, können Experimente bei Tier und Mensch zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Grundsätzlich sind also Ergebnisse, die in Tierversuchen gewonnen wurden, kritisch zu hinterfragen, bevor sie auf den Menschen übertragen werden können [53].

Genau wie Tierexperimente vermeiden *in vitro* Modelle die Risiken einer Patientenstudie. Sie ermöglichen die schnelle und definierte Veränderung der Untersuchungsparameter, sind daher kostengünstig und generieren reproduzierbare Ergebnisse. Physiologische Zusammenhänge werden dagegen meist unzureichend berücksichtigt.

So verwendet bislang kein Sonothrombolysemodell physiologische Flussverhältnisse, obgleich die Bedeutung der durch sie am Thrombus induzierten Scherkräfte immer wieder hervorgehoben wird [26, 52, 54]. Die meisten publizierten *in vitro* Modelle verwenden einen statischen Versuchsaufbau. Dabei wird die Wirkung von Thrombolytika und Ultraschall auf Thromben untersucht, die sich in einer Küvette befinden. Messgrößen sind die Gewichtsveränderung [6, 23, 29, 30, 49, 51] oder die Radioaktivität der umgebenden Lösung bei zuvor radioaktiv markierten Thromben [35, 60]. Andere Forschungsgrup-

pen verwenden Versuchsanordnungen, in denen der Thrombus Strömungen mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit ausgesetzt ist [7, 28, 43, 46, 57]. Der Fluss wird dabei meist durch den hydrostatischen Druck einer Flüssigkeitssäule erzeugt [7]. Die Reperfusion wird durch Ausliterung der am Thrombus vorbeiströmenden Flüssigkeit [7], durch fotoelektrische Verfahren [46] oder mit Hilfe der aufgezeichneten Flussgeschwindigkeit [28] gemessen. Die Thrombolysen werden auch hier durch Gewichtsmessungen [43, 57] oder anhand der Konzentration fortgespülter, radioaktiv markierter Thrombuspartikel [28] bestimmt. Nur wenige Gruppen verwenden Rollerpumpen, die pulsatile aber dennoch unphysiologische Flüsse erzeugen [34]. Um die hämodynamischen Einflüsse berücksichtigen zu können, denen der Thrombus im Blutkreislauf des Patienten ausgesetzt ist, müssen jedoch physiologische Flussverhältnisse im Modell generiert werden.

Ein weiterer großer Nachteil der meisten *in vitro* Modelle besteht darin, dass die Thrombolysen nur zu bestimmten Zeitpunkten gemessen werden kann. Kontinuierlich arbeitende Messverfahren wurden nur von wenigen Arbeitsgruppen verwendet [28, 46]. Kenntnisse über die zeitliche Dynamik der Thrombolysen sind jedoch von entscheidender Bedeutung, wenn man beispielsweise die Fragen nach der optimalen Insonationsdauer des Ultraschalls oder der zeitlichen Korrelation zwischen Ultraschall und rt-PA-Gabe beantworten will. Zur Entwicklung effizienter und gleichzeitig sicherer Lysestrategien muss die Thrombolysen daher zeitkontinuierlich gemessen werden.

Schließlich lässt sich die Thrombolysen in den meisten Modellen nur bestimmen, wenn der Thrombus aus dem Versuchsstand herausgenommen wird. Ein Beispiel dafür ist das weitverbreitete Verfahren der Gewichtsmessung. Durch solche Methoden wird der Prozess der Thrombolysen immer wieder unterbrochen und der Thrombus mechanisch beeinflusst. Das kann zu großen Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Thrombolysen führen. Die Messungen sollten daher kontaktfrei erfolgen.

2.2.1. Thrombusmodelle

Ogleich die bislang entwickelten Versuchsmodelle zum Teil recht verschieden sind, benötigen sie alle einen Thrombus, an dem die Effekte fibrinolytischer Therapien untersucht werden.

In der Fachliteratur lässt sich eine große Anzahl von Gerinnungsprotokollen finden, die

erstaunlich vielfältig sind. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden spontangeronnenes humanes Vollblut [30, 43, 62] oder rekalkifiziertes Vollblut, das zuvor in Citratröhrchen aufbewahrt wurde [15, 49, 51]. Aufgrund der Verwendung uneinheitlicher Thromben können die Lyseraten vieler Forschungsgruppen nicht miteinander verglichen werden. Um unterschiedliche Lysestrategien und Messverfahren gemeinsam auszuwerten und weiterentwickeln zu können, bedarf es also eines allgemein anerkannten Standardthrombus.

2.3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Um die Wirkmechanismen der Sonothrombolyse besser untersuchen zu können, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell entwickelt werden, das die Parameter der Sonothrombolyse einer systematischen und reproduzierbaren Erforschung zugänglich machen kann. Im Gegensatz zu allen bislang vorgestellten experimentellen Ansätzen sollen dabei physiologische Fluss- und Druckverhältnisse einstellbar sein, um insbesondere die klassische Situation eines embolischen Verschlusses der A. cerebri media simulieren zu können. Weiterhin soll das Modell die zeitkontinuierliche Erfassung der Thrombolyse während eines Experiments ermöglichen, ohne dass dabei der Thrombus manipuliert werden muss.

Zusammenfassung:

Die einzige wirkungsvolle, nichtinvasive Akuttherapie embolisch oder artherothrombotisch bedingter Hirninfarkte ist derzeit die systemische Thrombolyse. Diese Therapie kann jedoch nicht nur zu intrakraniellen sondern auch zu systemischen Blutungen führen, was die Anwendbarkeit dieser Methode deutlich limitiert.

Die Anwendung von Ultraschall stellt eine vielversprechende Therapieoption dar, die einerseits die positiven lokalen Effekte der systemischen Lyse steigern und andererseits als Monotherapie auch bei solchen Patienten eingesetzt werden kann, bei denen die systemische Lyse kontraindiziert ist.

Die Wirkungsweise der Sonothrombolyse ist jedoch bislang nicht im Detail verstanden und die optimale Einstellung ihrer Insonationsparameter noch nicht gefunden worden. Sicher ist nur, dass die Sonothrombolyse bei zu niedrigen Sendefrequenzen, einer zu

hohen Schallenergie oder zu langen Insonationsdauern, insbesondere in Kombination mit der systemischen Lyse, intrakranielle Blutungen auslösen kann.

Für die weitere Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Sonothrombolyse eignen sich *in vitro* Modelle, da so Risiken für Patienten vermieden werden können. Bisherige Modellansätze berücksichtigen jedoch nicht die hämodynamischen Verhältnisse im Bereich des Thrombus und lassen keine zeitkontinuierliche und kontaktfreie Bestimmung des Lyseprozesses unter definierten Rahmenbedingungen zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Realisierung und anschließende Validierung eines *in vitro* Modells, das für die Sonothrombolyseforschung zeitkontinuierliche und kontaktfreie Untersuchungen unter physiologischen, pulsatilen Strömungsverhältnissen erlaubt.

Der Modellaufbau wird im folgenden Kapitel erläutert.

3. Material und Methoden: Das Lübecker Flussmodell

Basierend auf den Ausführungen des vorangegangenen Kapitels sollte das zu erstellende Modell die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Das Modell soll Versuche unter physiologischen und somit pulsatilen Strömungsverhältnissen ermöglichen, um den hämodynamischen Einfluss von Kreislaufparametern, wie beispielsweise Herzfrequenz und Blutdruck, auf den Prozess der Thrombolyse erfassen zu können.
- Die Messungen sollen zeitkontinuierlich durchführbar sein, um den dynamischen Prozess der Thrombolyse zeitlich auflösen zu können.
- Die Bestimmung der Thrombolyse soll kontaktfrei erfolgen, damit die Thrombolyse nicht durch den Vorgang der Messung unterbrochen oder beeinflusst wird.
- Alle für die Thrombolyse relevanten Parameter sollen leicht zu kontrollieren und möglichst stufenlos einstellbar sein, um reproduzierbare Versuchsreihen durchführen zu können.
- Das Modell soll die gleichzeitige Applikation von Thrombolytika, Echosignalverstärkern und Ultraschallwellen erlauben, so dass auch Thrombolyseverfahren mit einem gemeinsamen Einsatz dieser drei Komponenten untersucht werden können.
- Schließlich sollen die laufenden Kosten des Modells möglichst gering und die Inbetriebnahme des Messstandes möglichst einfach und zeitsparend sein, damit auch eine größer Anzahl von Experimenten problemlos zu bewältigen ist.

Das so entwickelte Modell ist schematisch in [Abb.3.1](#) dargestellt.

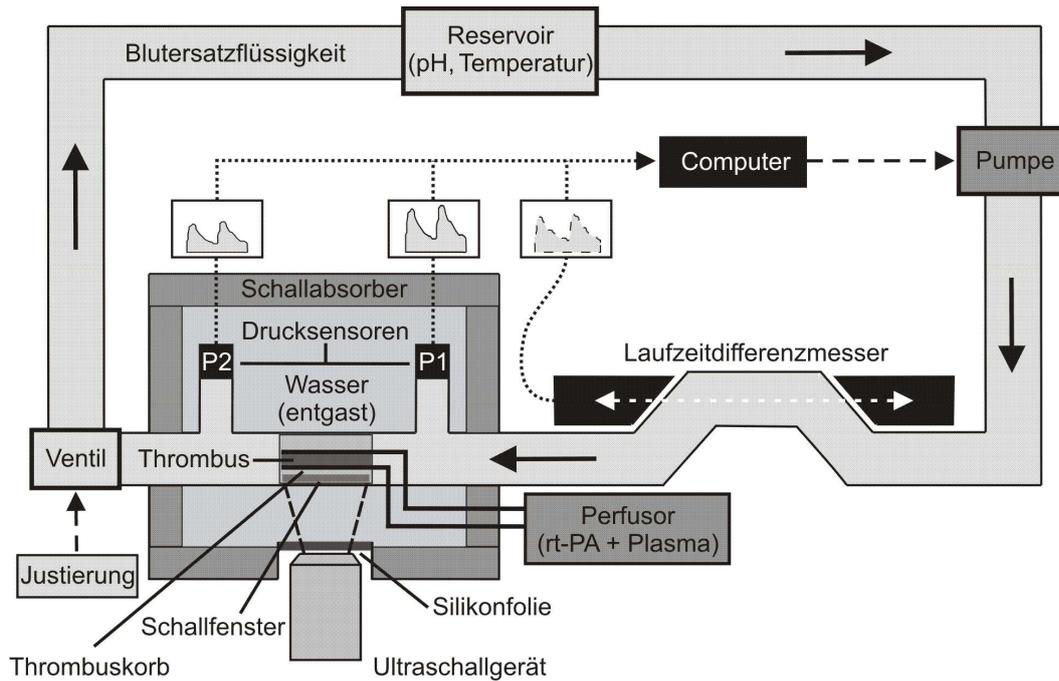


Abb. 3.1.: Modellaufbau. Eine ausführliche Beschreibung findet sich im Text. Die durchgezogenen Pfeile geben die Flussrichtung der Blutersatzflüssigkeit an. Die gestrichelten Pfeile stellen die Möglichkeiten zur Beeinflussung der hydrodynamischen Bedingungen innerhalb des Modells dar. Die gepunkteten Pfeile kennzeichnen den Weg der Datenerfassung. Der weiße Doppelpfeil entspricht der Laufrichtung des Ultraschalls bei der Laufzeitdifferenzmessung (vgl. Abschn. 3.2). Zur besseren Übersicht ist nur eins der zwei parallel angeordneten Nadelventile abgebildet.

Der Thrombus wird in einem speziellen Thrombuskorb innerhalb eines geschlossenen Schlauchsystems platziert. Als Blutersatzflüssigkeit fungiert eine isotone Elektrolytlösung (Ringer-Lösung, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Deutschland), die durch eine computergesteuerte Pumpe angetrieben wird und durch das Schlauchsystem zirkuliert. Temperatur und pH-Wert der Blutersatzflüssigkeit werden in einem Flüssigkeitsreservoir bei physiologischen Werten konstant gehalten. Zwei parallel angeordnete, fein justierbare Nadelventile sorgen dafür, dass neben einer definierten Flussgeschwindigkeit auch stufenlos kontrollierbare Druckverhältnisse innerhalb des Schlauchsystems herrschen. Die Pumpe, das Schlauchstück mit dem thrombusgefüllten Korb und die Nadelventile simulieren jeweils das Herz, das thrombosierte Gefäß sowie den peripheren Widerstand eines Patienten. Der Schlauchabschnitt, in dem sich der Thrombuskorb befindet, verläuft durch ein mit physiologisch temperiertem und entgastem Wasser gefülltes Becken, dessen Wände mit Schallabsorbern ausgekleidet sind. Durch eine Aussparung in der Beckenvorderwand, die mit einer dünnen Silikonfolie abgedichtet

ist, können Ultraschallwellen senkrecht zur Flussrichtung der Blutersatzflüssigkeit auf den Thrombus gerichtet werden. Thrombolytische Substanzen können gemeinsam mit Blutplasma über spezielle Schläuche direkt in den Thrombuskorb injiziert werden. Über einfache Luer-lock-Anschlüsse lassen sich vor dem Thrombuskorb Echosignalverstärker in das Schlauchsystem applizieren. Ein Laufzeitdifferenzmesser und zwei Drucksensoren, die kurz vor und hinter dem Thrombuskorb an das Schlauchsystem angeschlossen sind, ermöglichen eine zeitkontinuierliche Erfassung der Flussgeschwindigkeit sowie der Druckwerte vor und hinter dem Thrombus. Aus den erfassten Zustandsgrößen kann der Strömungswiderstand des Thrombus berechnet werden. Aufgrund der speziellen Form des Thrombuskorbes besteht eine direkte Relation zwischen dem gemessenen Strömungswiderstand und der Größe des Thrombus. Auf diese Weise kann über eine kontaktfreie und zeitkontinuierliche Messung der hydrodynamischen Zustandgrößen das Ausmaß der Thrombolyse bestimmt werden.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Komponenten des Aufbaus hinsichtlich ihrer Funktionalität detailliert vorgestellt.

3.1. Computergesteuerte Exzentrerschneckenpumpe

Verwendet wird eine Exzentrerschneckenpumpe vom Typ 2-E15A der Firma Netzsch (Netzsch Mohnopumpen GmbH, 84478 Waldkraiburg, Deutschland). Die Pumpe zählt zur Gruppe der rotierenden Verdrängerpumpen. Hauptbestandteile sind ein sich drehender Kolben, der sogenannte Rotator und ein feststehendes Gehäuse, der sogenannte Stator, in dem sich der Rotator drehend bewegt (Abb.3.2).

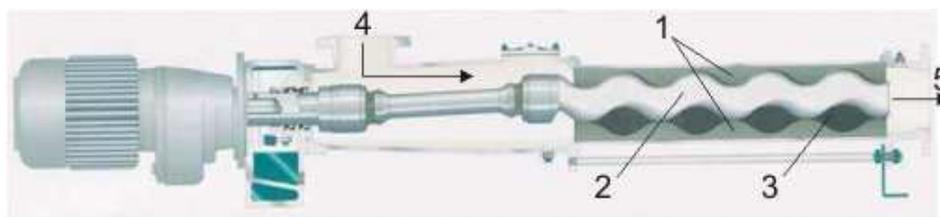


Abb. 3.2.: Konstruktionsprinzip der verwendeten Exzentrerschneckenpumpe. Als wesentliche Komponenten der Pumpe sind der unbewegliche Stator (1) und der sich im Stator drehende Rotator (2) zu erkennen. Aufgrund der speziellen Geometrie von Stator und Rotator verbleiben zwischen diesen beiden Bauteilen Förderräume (3), die sich bei Inbetriebnahme der Pumpe von der Eintritts- (4) zur Austrittsseite (5) des zu transportierenden Mediums bewegen. (Modifizierte Grafik nach freundlicher Genehmigung der Firma Netzsch)

3. Material und Methoden: Das Lübecker Flussmodell

Der Rotator ist wie eine Rundgewindeschraube mit extrem großer Steigung, großer Gangtiefe und kleinem Kerndurchmesser aufgebaut. Der Stator hat einen Gewindegang mehr und die doppelte Steigungslänge des Rotators. Dadurch bleiben zwischen dem Stator und dem sich darin drehenden Rotator Förderräume, die sich kontinuierlich von der Eintritts- zur Austrittsseite bewegen. In diesen Förderkammern wird das Medium transportiert. Ventile zur Begrenzung der Förderräume werden nicht benötigt. Die Pumpenfördermenge lässt sich stufenlos über die Drehzahl der Pumpe verändern.

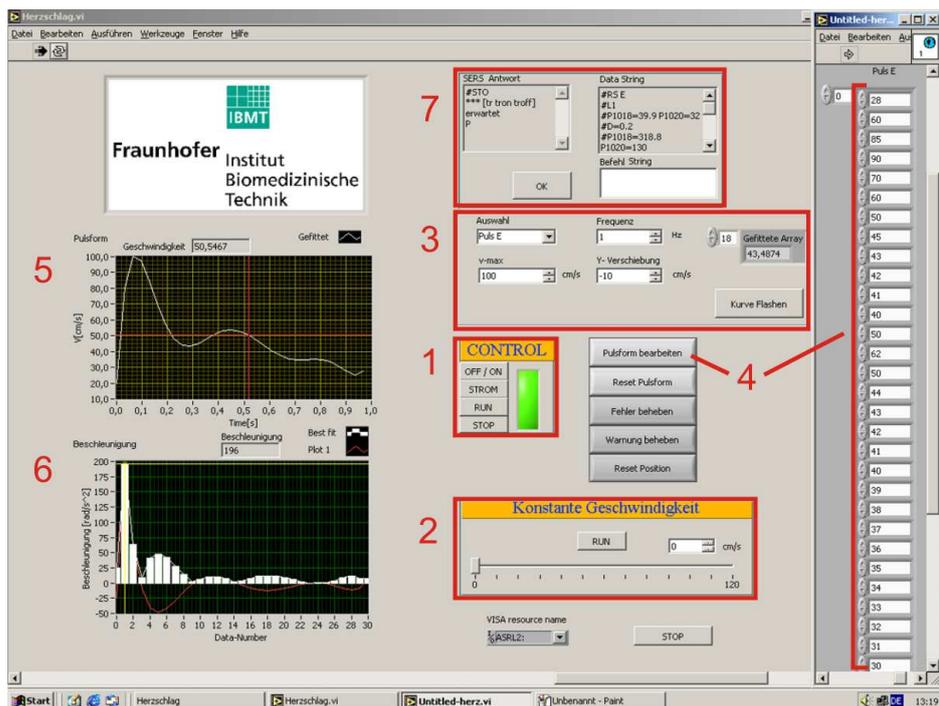


Abb. 3.3.: Programmoberfläche zur Steuerung der Exzentrerschneckenpumpe. Kontrollfenster (1) zur Aktivierung der Stromversorgung (STROM), zum Ein- und Ausschalten der Pumpe (OFF/ON), zum Starten der dynamischen Flussgeschwindigkeitspulse (RUN) und zum Anhalten der Pumpe (STOP). Kontrollfeld zur Einstellung konstanter Flussgeschwindigkeiten (2). Eingabefelder zur Modifikation der pulsatischen Flusspulskurven (3). Hier können aus einem Menü bereits erstellte Flussgeschwindigkeitsprofile ausgewählt, die maximale Flussgeschwindigkeit und Frequenz des Profils verändert und eine Verschiebung des gesamten Profils auf der Flussgeschwindigkeitsachse vorgenommen werden. Anschließend muss das erzeugte Geschwindigkeitsprofil an das Steuergerät durch Drücken der Taste (KURVE FLASHEN) übergeben werden. Einzelne Punkte des Flussgeschwindigkeitsprofils lassen sich durch die direkte Eingabe von Flussgeschwindigkeitswerten verändern (4). Geschwindigkeitsprofil (5) und Beschleunigungsprofil (6) der erstellten Pulskurve werden online angezeigt. Input-Output-Interface des Steuergerätes (7).

Die Steuerung der Pumpe erfolgt über das Steuergerät SERS 06.85 V03 HK6 der Firma Stögra (Stögra Antriebstechnik GmbH, 81379 München, Deutschland) mit Hilfe eines eigens dazu in LabView 7.1 (IED GmbH, 22179 Hamburg, Deutschland) ent-

wickelten Programms. Pumpe, Steuergerät und Programm wurden vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBMT, 66386 St. Ingbert, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Mit dem Programm lassen sich sowohl konstante als auch pulsatile Flussgeschwindigkeitsprofile mit variablen Pulsformen generieren. Die Wiederholungsrate (Frequenz) der pulsatilen Flussgeschwindigkeitsprofile kann in einem Bereich von 0.1 bis 2 Hz variiert werden. Im Rahmen des Versuchsaufbaus lassen sich Flussgeschwindigkeiten von 0 bis 95 cm/s einstellen. Eine Übersicht der Benutzeroberfläche des verwendeten Programms liefert die Abbildung 3.3.

Als Vorlage für die pulsatilen Flussgeschwindigkeitsprofile, die in unseren Versuchen verwendet werden, dienen duplexsonographisch erfasste Flussgeschwindigkeitsprofile in der A. carotis interna (ACI) gesunder Probanden.

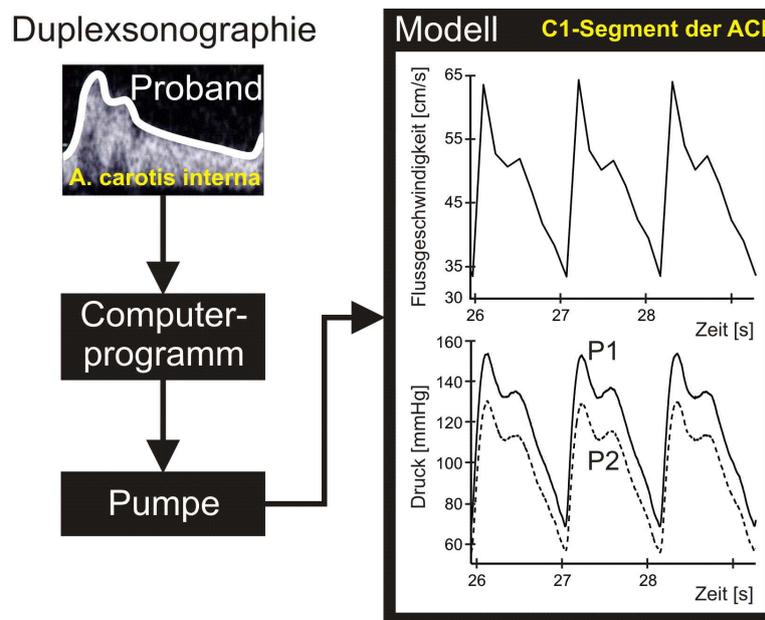


Abb. 3.4.: Generierung physiologischer Flussverhältnisse im Bereich des modellierten C1-Segments der A. carotis interna. Mittels Duplexsonographie wird das Flussgeschwindigkeitsprofil der Blutströmung in der A. carotis interna (ACI) gesunder Probanden bestimmt und in ein Computerprogramm übertragen, das die Exzentrerschneckenpumpe steuert. Innerhalb des Modells wird die Form des Flussgeschwindigkeitsprofils durch die nicht beeinflussbaren physikalischen Eigenschaften des Schlauchsystems verändert. Durch eine Regulierung der hydrodynamisch wirksamen Parameter (Widerstand des Nadelventils, Geschwindigkeitsprofil des Steuerprogramms) erfolgt solange eine gezielte Korrektur, bis am Laufzeitdifferenzmesser kurz vor dem montierten Thrombuskorb das Flussgeschwindigkeitsprofil einem klassischen physiologischen Geschwindigkeitsprofil im distalen Abschnitt der A. carotis interna (dem sog. C1-Segment) gleicht. Die Differenz der Druckpulskurven, die vor (P1) und hinter (P2) dem Thrombuskorb gemessen werden, ist dabei abhängig vom hydrodynamischen Widerstand des Thrombuskorbes, der Größe des eingesetzten Thrombus, der eingestellten Flussgeschwindigkeit und vom peripheren Flusswiderstand des Nadelventils.

Die duplexsonographisch gewonnenen Flussgeschwindigkeitswerte werden in das Steuerungsprogramm der Pumpe eingegeben. Durch Modifikation der Programmparameter und durch Justierung der Nadelventile, die sich hinter dem Thrombuskorb im Schlauchsystem befinden, wird kurz vor dem Thrombuskorb ein Flussgeschwindigkeitsprofil erzeugt, das mit einem klassischen, physiologischen Flussgeschwindigkeitsprofil im distalen Abschnitt der ACI (dem sog. C1-Segment) übereinstimmt (Abb. 3.4).

3.2. Laufzeitdifferenzmesser

Die Flussgeschwindigkeit der strömenden Blutersatzflüssigkeit wird über eine Laufzeitdifferenzmessung berechnet. Das entsprechende Gerät wurde vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert zur Verfügung gestellt.

Das Prinzip der Messung basiert auf zwei Ultraschallwandlern, die so ausgerichtet sind, dass ihre Schallachsen zu einer einheitlichen Messachse zusammenfallen, die wiederum mit der Strömungsrichtung der zu untersuchenden Flüssigkeit einen Winkel α einschließt (Abb. 3.5).

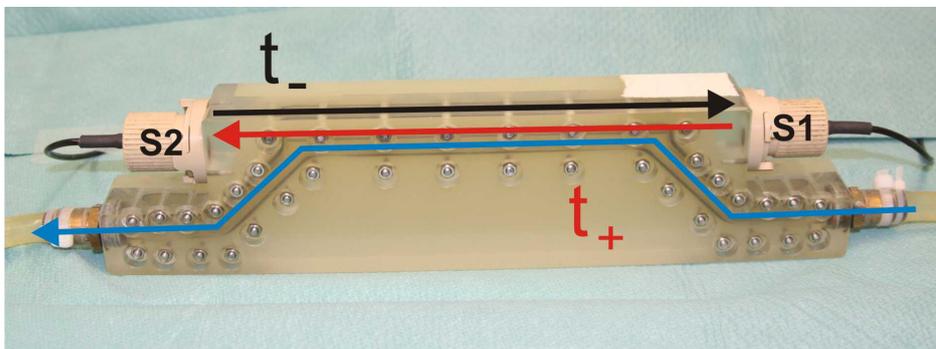


Abb. 3.5.: Prinzip der Flussgeschwindigkeitsmessung. Zwei Ultraschallwandler S1 und S2 fungieren wechselseitig als Sender und Empfänger von Ultraschallwellen, die alternierend in Richtung (roter Pfeil) und entgegen (schwarzer Pfeil) der Flussrichtung der Blutersatzlösung (blauer Pfeil) emittiert werden. Aus der Differenz der beiden gemessenen Laufzeiten des Ultraschalls t_- und t_+ kann die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit berechnet werden.

Die beiden Ultraschallwandler fungieren abwechselnd als Sender und Empfänger, wobei immer gleichzeitig ein Wandler als Sender und der andere als Empfänger arbeiten muss, so dass in beiden Richtungen Ultraschall emittiert bzw. empfangen wird. Damit ergeben sich, je nach Ausbreitungsrichtung unterschiedliche Laufzeiten t des emittierten Ultraschallimpulses. Breitet sich das Ultraschallsignal in Strömungsrichtung aus,

verringert sich seine Laufzeit auf den Wert t_+ . Muss sich das Ultraschallsignal entgegen der Strömungsrichtung in der bewegten Flüssigkeit ausbreiten, benötigt das Signal für die gleiche Distanz eine längere Laufzeit t_- . Aus den gemessenen Laufzeiten kann dann die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit wie folgt berechnet werden:

Ist c die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls in der unbewegten Flüssigkeit, v die Geschwindigkeit der strömenden Flüssigkeit, α der Winkel zwischen Messachse und Strömungsrichtung und l die Länge des Weges, den der Ultraschall in der strömenden Flüssigkeit zurücklegen muss, dann gilt für die Laufzeiten in (t_+) und gegen die Strömungsrichtung (t_-) sowie für die Laufzeitdifferenz Δt :

$$t_+ = \frac{l}{c + v \cdot \cos(\alpha)} \quad , \quad (3.1)$$

$$t_- = \frac{l}{c - v \cdot \cos(\alpha)} \quad , \quad (3.2)$$

$$\Delta t = t_- - t_+ = \frac{2lv \cdot \cos(\alpha)}{c^2 - v^2 \cdot \cos^2(\alpha)} \quad . \quad (3.3)$$

Da c^2 sehr viel größer als v^2 ist, gilt für die Laufzeitdifferenz in guter Näherung:

$$\Delta t = \frac{2lv}{c^2} \cos(\alpha) \quad . \quad (3.4)$$

Die Summenlaufzeit $\sum t$ der Ultraschallwelle beträgt für den Hin- und Rückweg bei gleicher Näherung:

$$\sum t = t_- + t_+ = \frac{2l}{c} \quad . \quad (3.5)$$

Aus Gleichung 3.4 und 3.5 erhält man schließlich für die Flussgeschwindigkeit der strömenden Flüssigkeit:

$$v = \frac{2l}{\cos(\alpha)} \cdot \frac{\Delta t}{(\sum t)^2} \quad . \quad (3.6)$$

Der erste Faktor ist eine Konstante, wobei in unserem Aufbau aufgrund der speziellen Geometrie des Laufzeitdifferenzmessers auch noch vereinfachend $\alpha = 0$ bzw. $\cos(\alpha) = 1$ gilt. Die Flussgeschwindigkeit v ist somit eine Funktion der gemessenen Laufzeiten:

$$v = konst. \cdot \frac{t_- - t_+}{(t_- + t_+)^2} \quad . \quad (3.7)$$

3.3. Thrombuskorb

Von zentraler Bedeutung für das Modell ist die Entwicklung eines geeigneten Thrombuskorbes. Der Korb steht nicht nur räumlich im Mittelpunkt des Aufbaus. Von seiner Form hängt es ab, ob das Prinzip des Messplatzes, nämlich die Bestimmung der Thrombolyse aus den aufgezeichneten Druck- und Flussgeschwindigkeitswerten, überhaupt realisierbar ist. Daher werden an die Beschaffenheit des Korbes eine Vielzahl von Anforderungen gestellt:

- Zunächst muss gewährleistet sein, dass sich eine Verkleinerung des Thrombus überhaupt in einer Änderung des hydrodynamischen Widerstandes widerspiegelt. Im Rahmen eines Massenverlusts wird sich der Thrombus verkürzen, da er innerhalb des Schlauchsystems einer starken Strömung ausgesetzt ist, die ihn so weit wie möglich komprimiert. Eine Halterung, die den Thrombus lediglich im Schlauchsystem fixiert, würde deshalb trotz einer zunehmenden Verkleinerung des Thrombus einen konstanten Strömungswiderstand hervorrufen, da der Querschnitt des Schlauchs solange vom Thrombus komplett verlegt sein wird, bis sich dieser fast vollständig aufgelöst hat. Die Form des Korbes muss also in erster Linie Änderungen der Thrombuslänge in eine messbare Änderung des Strömungswiderstandes überführen.
- Es existiert eine Vielzahl klinischer Beispiele dafür, dass sich Thromben trotz eines verstärkten Einsatzes thrombolytisch wirksamer Maßnahmen nur inkomplett oder - im ungünstigsten Fall - überhaupt nicht auflösen lassen [65]. Der Thrombuskorb sollte daher so beschaffen sein, dass gerade die geringen Massenverluste des Thrombus messtechnisch gut aufgelöst und nachgewiesen werden können.
- Gleichzeitig sollte der unbeladene Korb der anströmenden Flüssigkeit einen möglichst geringen Eigenwiderstand entgegensetzen, um die bei einer Verkleinerung des Thrombus nachzuweisenden Widerstandsveränderungen nicht zu überlagern.
- Außerdem müssen trotz des Strömungswiderstands, den der Thrombuskorb erzeugt, Flussverhältnisse im Modell einstellbar sein, die mit den hämodynamischen Bedingungen im Bereich des C1-Segments der ACI zu vereinbaren sind.
- Die Art und Weise, in der der Thrombus innerhalb des Versuchsaufbaus fixiert wird, sollte ein physiologisches Äquivalent haben, damit die gewonnenen Erkennt-

nisse aus den Thrombolyseversuchen auch auf die *in vivo* stattfindenden Prozesse übertragen werden können.

- Schließlich muss der Korb eine geeignete Applikation der Ultraschallwellen und der thrombolytischen Substanzen gewährleisten.

In Abbildung 3.6 ist das Design des Korbes zu sehen. Im Anhang finden sich technische Zeichnungen, aus denen sich die genauen Abmessungen des Korbes entnehmen lassen.

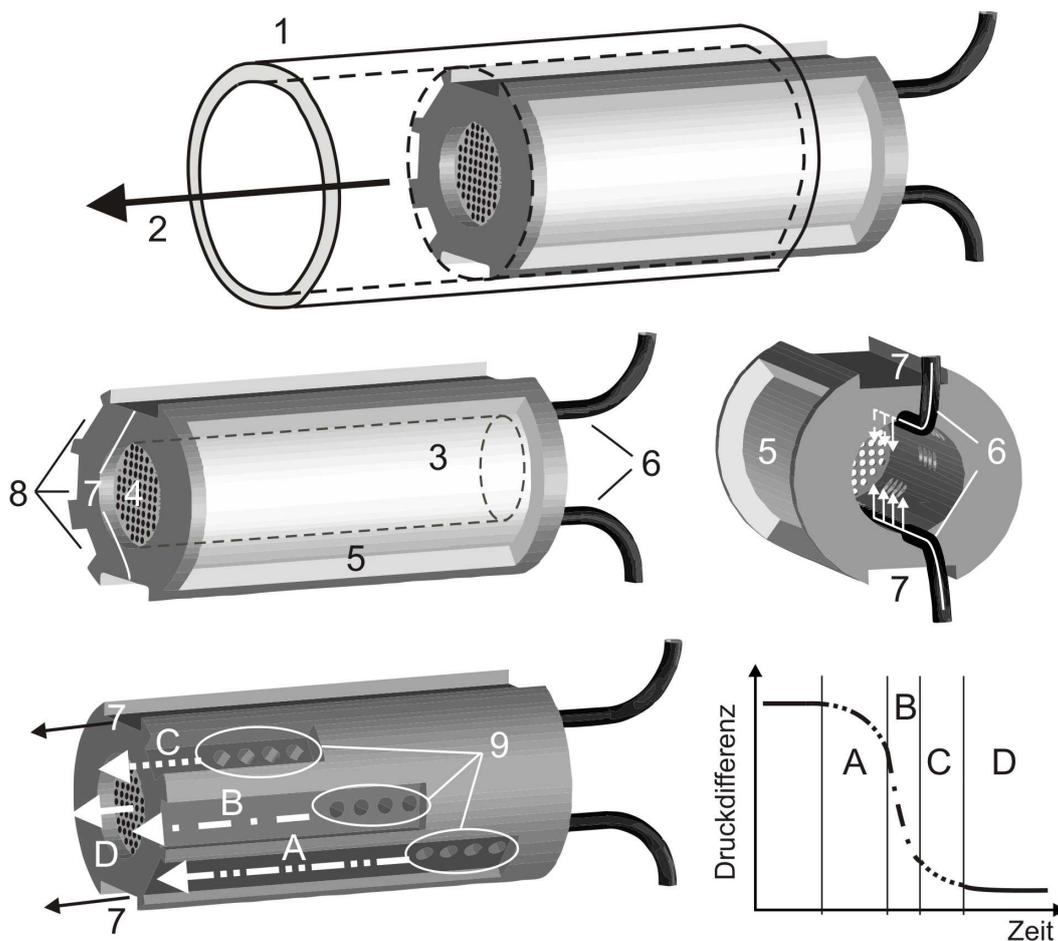


Abb. 3.6.: Aufbau und Funktionsweise des Thrombuskorbes. Ausschnitt des Schlauchsystems (1), Richtung der strömenden Blutersatzflüssigkeit (2), Hohlraum für den Thrombus (3), Gazeplatte (4), Schallfenster (5), zuführendes Schlauchsystem für thrombolytische Substanzen (6), Bypasskanäle zur Minimierung des Eigenwiderstands des Thrombuskorbes (7). Wird der Thrombus im Inneren des Korbes kleiner, öffnen sich immer mehr Löcher in der Wand des Thrombuskorbes (9), über die die Blutersatzflüssigkeit in Abflusskanäle (8) gelangt (um die Abbildung übersichtlicher zu gestalten wurden nur 3 der 4 Abflusskanäle dargestellt). Eine Auflösung des Thrombus führt so zu einem schrittweisen Öffnen der Abflusswege A - D bzw. zu einer kontinuierlichen Zunahme des für die Blutersatzflüssigkeit zur Verfügung stehenden Strömungsquerschnitts. Dadurch reduziert sich der hydrodynamische Widerstand des Thrombuskorbes bzw. die über den Korb abfallende und in den Versuchen gemessene Druckdifferenz. Die Grafik unten rechts zeigt den Zusammenhang zwischen der sukzessiven Öffnung der Abflusskanäle A - D und der messbaren Druckdifferenz.

Der Thrombuskorb besteht aus Polyoxymethylen (POM). POM ist ein hochmolekularer, thermoplastischer Kunststoff, der in einem weiten Temperaturbereich eine hohe Festigkeit und Härte sowie eine ausgezeichnete Steifig- und Formbeständigkeit besitzt und sich deshalb für die Fertigung von Präzisionsteilen anbietet. Darüber hinaus sprach ein niedriger Reibungskoeffizient für die Verwendung dieses Materials. Er ermöglicht einerseits die problemlose Einlage des Thrombus in den Thrombuskorb und andererseits die Einführung des Thrombuskorbes in das enganliegende Schlauchsystem. Die vergleichsweise geringe Dichte (1.41 g/cm^3) führt an den mit Wasser (Dichte bei 37°C : 1.0 g/cm^3) in Kontakt befindlichen Grenzflächen zu einer vergleichsweise geringen Reflexion und somit zu einem relativ geringen Intensitätsverlust der eingestrahnten Ultraschallwellen. Ein weiterer Vorteil stellt für unseren Versuchsaufbau die extrem geringe Wasseraufnahme von POM dar.

Während der Experimente befindet sich der Thrombuskorb innerhalb des Schlauchsystems. Seine Grundform entspricht einer zylindrischen Röhre mit einem konzentrischen Hohlraum, in dem der Thrombus platziert wird. Bezogen auf die Strömungsrichtung der im Schlauchsystem zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit ist das distale Ende des Hohlraums mit einer Gazeplatte verschlossen, so dass der Thrombus nicht aus dem Korb herausgespült werden kann.

Zwei dünne Schläuche, die außerhalb des Schlauchsystems an Perfusoren (Pilot A2, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) angeschlossen sind, ziehen längs des Hohlraums in den Thrombuskorb hinein. Plasma und thrombolytische Substanzen können so über kleine Austrittslöcher am Ende der Schläuche direkt zum Thrombus gelangen. Durch diese kontrollierte und konstante Applikationsform ist der Thrombus trotz der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit innerhalb des Korbes stets von einem Gemisch aus Plasma und Thrombolytikum umgeben.

Eine Materialaussparung an der Außenseite der Röhre dient als Schallfenster für den Ultraschall. Während des Experiments ist sie mit der Blutersatzflüssigkeit gefüllt und verringert so die Dämpfung der eingestrahnten Ultraschallwellen (vgl. Abschn. 4.5).

Zwei Vertiefungen in der Außenwand des Korbes bilden zusammen mit dem Schlauch, in dem sich der Korb befindet, zwei isolierte Bypasskanäle, in denen die Blutersatzflüssigkeit den Korb auch dann noch passieren kann, wenn dieser durch einen Thrombus komplett ausgefüllt ist. Auf diese Weise wird der Betrieb des Systems bei vollständig ge-

fülltem Thrombuskorb gewährleistet und der hydrodynamische Strömungswiderstand des Korbes reduziert.

Um die Größenabnahme des Thrombus in eine Reduktion des Strömungswiderstandes zu überführen, befinden sich vier voneinander getrennte, unterschiedlich lange und unterschiedlich tiefe Kanäle in der Außenwand des Korbes. Zusammen mit dem Schlauchstück, das den Korb umschließt, bilden sie Abflussrinnen, die über je vier kleine, gleichgroße Löcher in ihrem proximalen Abschnitt mit dem Hohlraum des Korbes in Verbindung stehen. Die Löcher der Abflussrinnen sind so angeordnet, dass sie gemeinsam die gesamte Länge des Hohlraumes im Inneren des Korbes abdecken. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der Abflussrinnen kommt es dabei zu keiner Überlappung.

Nimmt die Masse des Thrombus ab, kommt es durch die anströmende Blutersatzflüssigkeit zu einer Kompression des Restthrombus. Eine Thrombolysen bzw. eine Abnahme der Thrombusgröße führt also zu einer zunehmenden Verkürzung des Thrombus. Dadurch werden nacheinander die zuvor durch den Thrombus abgedeckten Löcher der Abflusskanäle freigelegt, zuerst die Löcher des längsten Kanals, danach die des zweitlängsten Kanals. Verkürzt sich der Thrombus weiter, öffnen sich immer mehr Abflusskanäle bis schließlich die zirkulierende Blutersatzflüssigkeit auch durch die abschließende Gazeplatte hindurchströmen kann. Je kleiner der Thrombus wird, desto größer wird also die Querschnittsfläche, über die die Blutersatzflüssigkeit am Thrombus vorbeifließen kann. Dadurch sinkt der hydrodynamische Widerstand des Thrombuskorbes. Die Widerstandsabnahme ist nach dem Ohm'schen Gesetz direkt proportional zur Abnahme der Druckdifferenz, die über dem Thrombuskorb anliegt. Diese Druckdifferenz lässt sich mit Hilfe der beiden, vor und hinter dem Thrombuskorb angeschlossenen Drucksensoren zeitkontinuierlich erfassen.

Die komplexe Gestalt des Thrombuskorbes ermöglicht so die Messung der Thrombolysen in Form einer abnehmenden Druckdifferenz.

Gleichzeitig lässt das vorgestellte Prinzip der Thrombusfixierung im Modell folgenden Vergleich mit den realen Gegebenheiten im zerebralen Blutgefäßsystem des Menschen zu: Kurz vor dem Schlauchstück, in dem sich der thrombusgefüllte Korb befindet, herrschen im Modell Druck- und Flussgeschwindigkeitswerte, wie sie im C1-Segment der ACI zu finden sind. Das Schlauchstück mit dem Thrombuskorb entspricht einer A. cerebri media, die durch einen embolisierten Thrombus verschlossen wurde. Die stets

offenen seitlichen Bypasskanäle des Thrombuskorbes finden ihr physiologisches Korrelat in den noch unverschlossenen hirnversorgenden Gefäßen des Circulus arteriosus willisii, wie der A. cerebri anterior oder dem Ramus communicans posterior, über die im Falle eines Verschlusses der A. cerebri media Blut abfließen kann. Durch die spezielle Zuführung des Plasmas und des Thrombolytikums direkt in das Innere des Thrombuskorbes wird der Umstand berücksichtigt, dass der Thrombus *in vivo* von Blut umgeben ist und das Thrombolytikum bei seiner intravenösen Applikation nicht nur von proximal, sondern über Kollateralen auch von distal an den Thrombus herangespült wird. Die Korbkonstruktion ermöglicht trotz der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit die Ausbildung eines physiologischen Mikromilieus innerhalb des Thrombuskorbes.

3.4. Drucksensoren

Zur Erfassung des Drucks verwenden wir Drucksensoren (REF I-99-IA-013, pvb[©]: Critical Care GmbH, Kirchseeon, Deutschland), die zur intraarteriellen Blutdruckmessung von Intensivpatienten eingesetzt werden (Abb. 3.7).

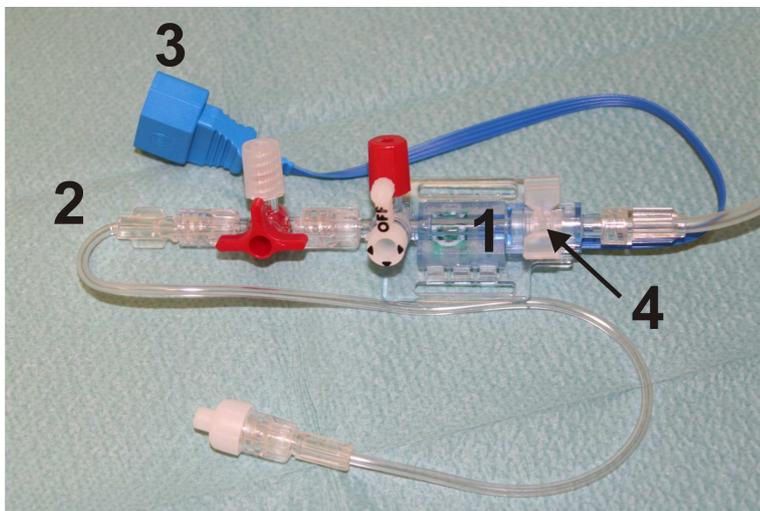


Abb. 3.7.: pvb[©]-Drucksensor. Piezoelektrischer Druckaufnehmer (1), Anschluss für den druckübertragenden Verbindungsschlauch (2), Kabel für die Übertragung des elektrischen Signals zum Mess-PC (3), Druckventil zur Entlüftung der Messkammer und des zuführenden Schlauchsystems (4).

Da sich die Sensoren nicht für einen Einsatz unter Wasser eignen, erfolgt ihre Montage außerhalb des wassergefüllten Beckens, durch das der Schlauchabschnitt mit dem Thrombuskorb hindurchläuft. Die Sensoren sind über Verbindungsschläuche mit dem

Schlauchsystem der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit konnektiert. Die Anschlussstellen der beiden Drucksensoren, die den Druck vor (P_1) und hinter dem Thrombuskorb (P_2) erfassen sollen, liegen jeweils 7 cm vom Mittelpunkt des Thrombuskorbes entfernt. Die Verbindungsschläuche bestehen aus PVC und haben einen Innendurchmesser von 4 mm bei einer Wanddicke von 1.5 mm. Da es sich bei der Blutersatzflüssigkeit um eine nahezu inkompressible Flüssigkeit handelt, kann es bei der Druckmessung am Sensor lediglich durch die dämpfende Wirkung der PVC-Wände der Verbindungsschläuche zu einer Verfälschung der im Schlauchsystem herrschenden Druckverhältnisse kommen. Um diesen störenden Einfluss möglichst gering zu halten, wurde die Länge der Verbindungsschläuche mit 15 cm so kurz wie möglich gehalten und der Aufbau der Drucksensoren streng symmetrisch durchgeführt. Beide Drucksensoren liegen in einer Ebene 15 cm oberhalb des Thrombuskorbes. Für die entscheidende Messgröße, die über dem Thrombuskorb anliegende Druckdifferenz $\Delta P = P_1 - P_2$, heben sich dadurch Fehler, die durch hydrostatische Einflüsse entstehen, auf.

3.5. Widerstands- und Überdruckventile

Zur Regulierung der Druckwerte im Schlauchsystem dienen zwei parallel in das Schlauchsystem eingesetzte Nadelventile (Teflon 1/8'' FNPT: Aalborg, Orangeburg / NY, USA). Über ein feines Drehgewinde lässt sich der Innendurchmesser der Ventile zwischen 0 und 3 mm stufenlos verstellen. Je kleiner die gewählten Innendurchmesser, desto höher wird der Flusswiderstand der Ventile und desto höher steigt der Druck in der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit.

Aus Sicherheitsgründen wurde zudem ein Überdruckventil (Typ DHV 715, ASV Stübbe GmbH & Co.KG, 32602 Vlotho, Deutschland) in das Schlauchsystem integriert. Es öffnet sich bei vorher eingestellten Druckwerten (für die Versuche wurde ein Wert von 360 mmHg gewählt) und schützt so die Apparatur vor einer Überlastung im Falle einer fehlerhaften Bedienung. Für die Versuche selbst hat das Überdruckventil keinerlei Bedeutung, weshalb es in der Skizze des Versuchsaufbaus (Abb.3.1) zugunsten einer besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt wurde.

3.6. Bestandteile des Blutersatzflüssigkeitskreislaufs

Die Blutersatzflüssigkeit zirkuliert, angetrieben durch die bereits beschriebene Exzentrerschneckenpumpe, durch ein Schlauchsystem. In das Schlauchsystem ist ein Reservoir eingebaut. Dort, wo sich der Thrombuskorb im Schlauchsystem befindet, durchzieht dieses ein Becken, das mit entgastem Wasser gefüllt ist (vgl. Abb. 3.1).

3.6.1. Schlauchsystem

Die Schläuche, in denen die Blutersatzflüssigkeit zirkuliert und mit denen die einzelnen Komponenten des Versuchsaufbaus verbunden sind, haben einen Innendurchmesser von 6 mm und eine Wandstärke von 3 mm. Sie bestehen aus PVC und sind mit einer verschiebungsfesten Synthesefadenarmierung versehen, die zwischen Innenschlauch und Ummantelung eingebettet ist. Die Schläuche weisen deshalb über weite Temperaturbereiche eine hohe Druckfestigkeit bei gleichzeitig guter Flexibilität auf und gewährleisten so, dass die Form der generierten Fluss- und Druckpulskurven auch bei schwankenden Druck- und Temperaturbelastungen nicht verfälscht wird.

Echosignalverstärker (wie Levovist[©] oder SonoVue[©]) lassen sich problemlos über Luer-lock-Verbindungen in das Schlauchsystem injizieren. In diesem Zusammenhang muss allerdings darauf geachtet werden, dass das Schlauchstück mit dem Thrombuskorb vertikal und mit dem distalen Ende nach oben gerichtet durch das wassergefüllte Becken verläuft, damit die nur wenige μm -großen Luft- bzw. Gasbläschen nicht durch die seitlich am Thrombuskorb befindlichen Abflussrinnen am Thrombus vorbeitreiben.

3.6.2. Blasenfänger

Die Anwesenheit von Luft im Schlauchsystem führt durch den Windkessel-Effekt zu einer störenden Veränderung der aufgezeichneten Druckpulskurven. Darüber hinaus beeinträchtigen Luftblasen die Flussgeschwindigkeitsmessung im Laufzeitdifferenzmesser, da der dazu benötigte Ultraschall an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser reflektiert wird, bevor er den gegenüberliegenden Empfänger erreicht. Schließlich können Luftblasen auch zu einer direkten Verfälschung der Lyseexperimente führen. Ei-

nerseits behindern sie die Applikation des auf den Thrombus gerichteten Ultraschalls und reduzieren somit dessen thrombolytische Wirkung. Andererseits können sie, wenn Bläschendurchmesser, eingestrahlte Ultraschallfrequenz und -intensität in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen, im Sinne eines Echosignalverstärkers zu einer mechanischen Auflockerung des Thrombus und dadurch zu einer verstärkten Thrombolyse führen (vgl. Abschn. 2.1).

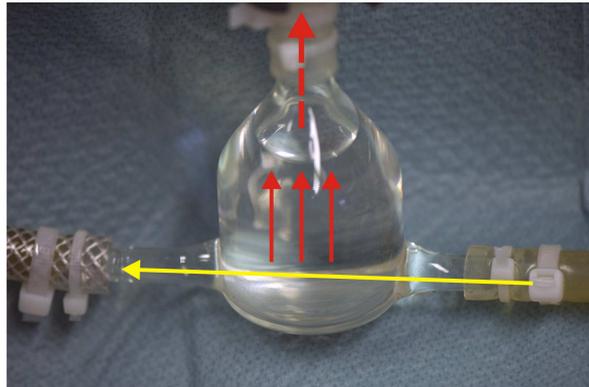


Abb. 3.8.: Funktionsweise des Blasenfängers. Während die im Schlauchsystem zirkulierende Blutersatzlösung am unteren Ende des Blasenfängers durch diesen hindurchströmt (gelber Pfeil), können Luftblasen in den oberen Bereich des konisch zulaufenden Glaskolbens aufsteigen (rote Pfeile). Die gesammelte Luft kann dann über ein Ventil aus dem Blasenfänger abgelassen werden (roter gestrichelter Pfeil).

Um störende Luftbläschen aus dem Schlauchsystem entfernen zu können, ohne dabei ein Experiment unterbrechen zu müssen, wurden spezielle Blasenfänger hergestellt (Abb. 3.8). Jeweils einer dieser nach oben hin konisch zulaufenden Glaskolben wurde vor und hinter den Laufzeitdifferenzmesser in das geschlossene Schlauchsystem integriert. Zu- und Abfluss der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit befinden sich direkt über dem Boden der Glaskolben. Befinden sich Luftbläschen in der strömenden Flüssigkeit, können sie innerhalb des Glaskolbens nach oben aufsteigen und über ein Ventil aus dem System entfernt werden.

3.6.3. Reservoir

Mit Hilfe des Reservoirs lassen sich Volumenschwankungen der Blutersatzflüssigkeit im Schlauchsystem jederzeit ausgleichen und darüber hinaus physiologische Temperatur- und pH-Werte konstant halten (Abb. 3.9).

Die zirkulierende Blutersatzflüssigkeit gelangt über einen Zufluss in das Reservoir, passiert dort einen Filter und verlässt das Reservoir über einen Abfluss am Boden in Richtung Pumpe. Durch den Filter lassen sich Thrombuspartikel aus der zirkulierenden Flüssigkeit entfernen. Ein zweiter Zufluss steht mit dem bereits beschriebenen Überdruckventil in Verbindung und fördert im Normalfall keine Flüssigkeit.

Steigt die Flüssigkeitsmenge innerhalb des Schlauchsystems, beispielsweise durch die Injektion von Plasma oder Thrombolytika, fließt überschüssige Flüssigkeit automatisch in einen Messbecher ab. Flüssigkeitsverluste, die in geringem Umfang durch Verdunstung entstehen, lassen sich über das Reservoir substituieren.

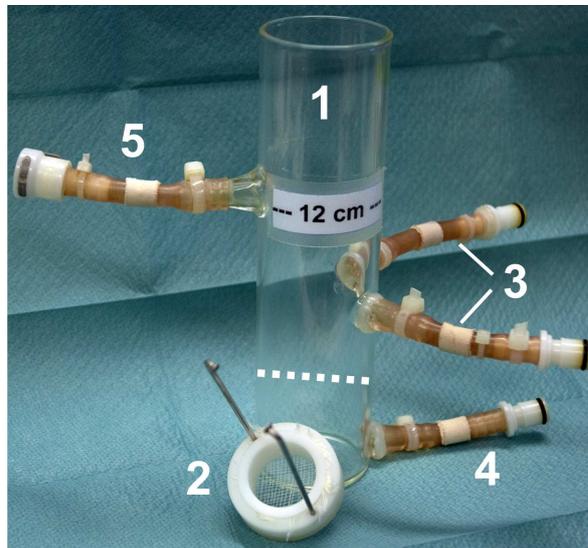


Abb. 3.9.: Reservoir der Blutersatzflüssigkeit. Reservoir (1), Filter (2), der sich während der Versuche in Höhe der gestrichelten Linie innerhalb des Reservoirs befindet, Zuflüsse (3), Abfluss (4) und Überlauf mit Anschluss für einen Messbecher (5).

3.6.4. Wasserbecken

Das wassergefüllte, $51.5 \times 34.0 \times 40.5$ cm große Becken soll die Ultraschallapplikation auf den Thrombus ermöglichen. Dazu darf sich keine Luft zwischen dem Ultraschallkopf und dem Thrombus befinden, weil es sonst zu einer Reflexion der Ultraschallwellen kommt. Das verwendete Wasser sollte deshalb entgast sein, was hinreichend gut durch ein Abstehen des Wassers im Becken über ein bis zwei Tage erreicht wird. Zur Vermeidung störender Ultraschallreflexionen sind die Beckenwände mit einem 5 cm dicken, profilierten Akustikschaumstoff ausgekleidet.

Insgesamt befinden sich in dem luftleeren Flüssigkeitskreislauf, bestehend aus den Schläuchen, dem Reservoir, den beiden Blasenfängern und den Förderräumen der Pumpe, 989 ml Blutersatzflüssigkeit. Diese relativ geringe Menge führt nicht nur zu einer Senkung der Betriebskosten des Modells, sondern auch zu einer geringeren Verdünnung der in das Schlauchsystem injizierten thrombolytischen Substanzen.

3.7. Temperatur- und pH-Wert-Regulierung

Das in Abschnitt 3.6.3 beschriebene Reservoir steht in einem $57 \times 17.5 \times 35$ cm großen Wärmebecken, in dem sich ein stufenlos regulierbares Einhängethermostat (Typ 850062, Firma AL, Deutschland) befindet. Die Temperatur wird am Einhängethermostat so gewählt, dass sich im Reservoir während des Versuchs eine konstante Temperatur von 37 °C einstellt.

Um die Thrombolyse unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wäre der Einsatz von Vollblut als zirkulierende Flüssigkeit im Modell wünschenswert. An den Oberflächen von Schläuchen und Pumpenbestandteilen würde dabei jedoch eine Gerinnung des Bluts ausgelöst werden. Die zusätzliche Verwendung von Antikoagulantien verbietet sich, da diese sowohl das Gerinnungs- als auch das Fibrinolyse-System in unvorhersehbarer Weise beeinflussen und so den zu untersuchenden Prozess der Lyse beeinträchtigen würden [47]. Aus diesem Grund muss das Modell mit einer möglichst physiologischen Blutersatzflüssigkeit betrieben werden. Verwendet wird dazu eine isotone Ringer-Lösung (Berlin-Chemie AG Menarini, 12474 Berlin, Deutschland), die durch den Zusatz einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland) einen pH-Wert von 7.4 aufweist.

3.8. Ultraschallgerät

Grundsätzlich gibt es von Seiten des Versuchsaufbaus keinerlei Einschränkungen bezüglich des zu verwendenden Thrombolytikums, Echosignalverstärkers oder Ultraschallwandlers. Für den in Abschnitt 5 beschriebenen Versuch wurde als Ultraschallquelle ein SONOS 2500 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) verwendet und im

transkraniellen, farbkodierten Modus mit einer Sendefrequenz von 2MHz und einer Leistungsdichte von 179 mW/cm^2 betrieben (Leistung: 100 %; Wandfilter: 100 Hz; Aliasschwelle: 25 cm/s; Torlänge des Sample volumes: 0.29 cm). Damit wurde eine Form der Ultraschallapplikation gewählt, die für gewöhnlich in der klinischen Diagnostik bei der Darstellung intrakranieller Gefäße zur Anwendung kommt.

3.9. Datenerfassung

3.9.1. Aufzeichnung der Druckwerte

Das Datenerfassungsprogramm, das die von den Sensoren (vgl. Abschn. 3.4) gemessenen Druckwerte aufzeichnet, wurde mit Hilfe der Software LabVIEW 7.1 erstellt. Abbildung 3.10 zeigt das Userinterface des Programms. Es erlaubt die Darstellung der erfassten Druckwerte in Echtzeit und ermöglicht so dem Untersucher eine kontinuierliche Überwachung des Versuchsablaufs.

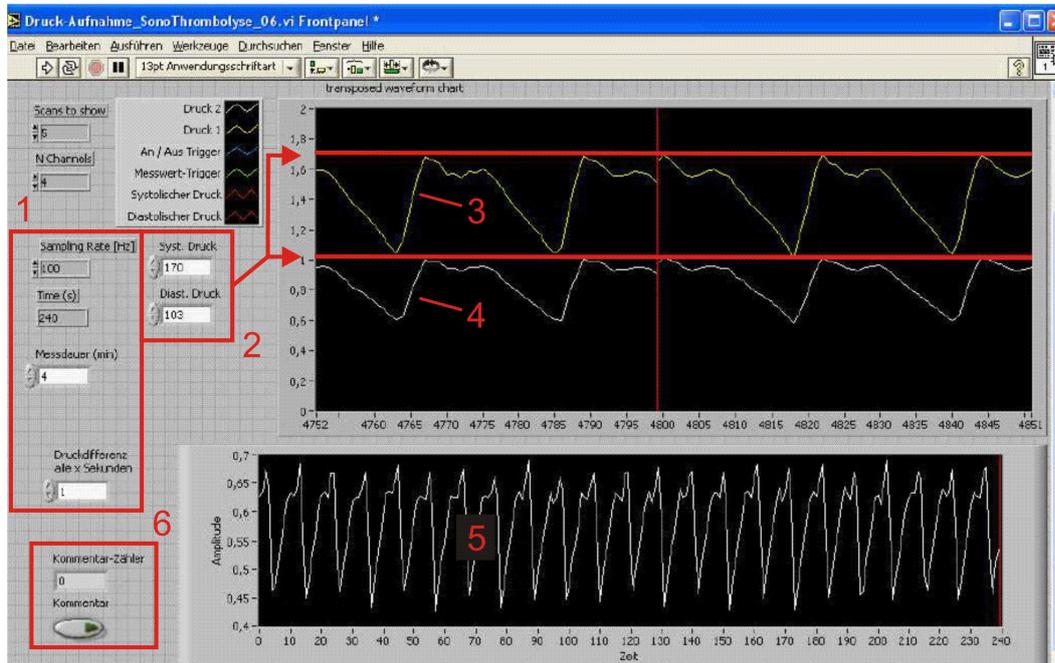


Abb. 3.10.: Oberfläche des LabVIEW-Programms zur Aufzeichnung der Druckpulskurven. Eingabefenster zur Wahl der Abtastraten und der Aufzeichnungsdauer (1). Durch verschiebbare Hilfslinien (2) lassen sich Veränderungen der systolischen und diastolischen Druckwerte leichter verfolgen. Online Darstellung der Druckwerte vor (3) und hinter (4) dem Thrombuskorb sowie der über den Korb abfallenden Druckdifferenz (5). Zur Markierung bestimmter Ereignisse können während des Versuchs Kommentare gesetzt werden (6).

3.9.2. Aufzeichnung der Flussgeschwindigkeitswerte

Der in Abschnitt 3.2 beschriebene Laufzeitdifferenzmesser wird von einem LabVIEW-Programm gesteuert, das gleichzeitig auch der Erfassung der erhobenen Daten dient. Das Programm wurde vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert programmiert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. In der Abbildung 3.11 ist die kombinierte Ein- und Ausgabeoberfläche des Programms zu sehen.

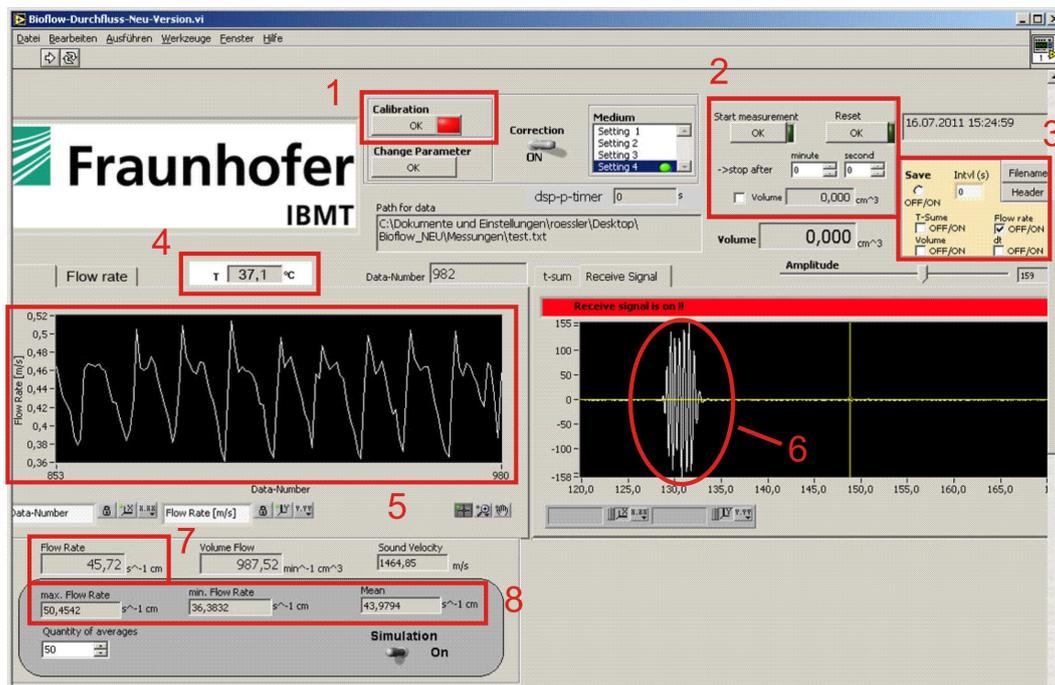


Abb. 3.11.: Oberfläche des LabVIEW-Programms zur Erfassung der Flussgeschwindigkeit. Aktivierung der Kalibrierung (1). Bedienfeld zum Starten und Beenden der Messung (2). Feld zur Auswahl der zu erfassenden Daten (3). Anzeige der Temperatur der im Modell zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit (4). Echtzeitdarstellung der gemessenen Flussgeschwindigkeit (5). Frequenzband des Ultraschalls, mit dem die Flussgeschwindigkeit gemessen wird (6). Aktueller Wert der Flussgeschwindigkeit (7). Ausgabe der maximalen, minimalen und der mittleren Flussgeschwindigkeit (8).

Vor jedem Versuch wird unter Berücksichtigung der aktuellen Temperatur der Blutersatzflüssigkeit ein Nullabgleich des Laufzeitdifferenzmessers bei ausgeschalteter Pumpe durchgeführt. Die anschließende Messung der Flussgeschwindigkeit erfolgt dann mit einer Abtastrate von 1 Hz, sofern die Laufzeitdifferenzmessung nicht durch zirkulierende Luftblasen gestört wird.

3.10. Thrombusgenerierung

Wie in Abschnitt 2.2.1 bereits erwähnt, gibt es bislang kein einheitliches Thrombusmodell, auf das für *in vitro* Versuche zur Thrombolyse zurückgegriffen werden könnte. Vielmehr existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Gerinnungsprotokolle zur Herstellung der Thromben. Die beiden bislang am häufigsten angewendeten Gerinnungsprotokolle basieren zum einen auf der spontanen Gerinnung von humanem Vollblut [30, 43, 62] und zum anderen auf der Gerinnung von rekalfiziertem Citratblut [15, 45, 49]. Die so generierten Thromben waren jedoch nicht stabil genug, um den im Modell vorherrschenden Strömungsbedingungen standhalten zu können. Vielmehr wurden sie direkt nach Inbetriebnahme der Pumpe vollständig mechanisch zerstört. Viele andere Gerinnungsprotokolle erschienen zu kompliziert und gleichzeitig nicht physiologisch begründbar zu sein [51] oder zielten auf eine gänzlich andere Methode zur Messung der Thrombolyse ab, wie beispielsweise die Bestimmung von radioaktiv markiertem Fibrinogen, dass aus dem Thrombus während der Lyse herausgelöst wird [8, 35, 60]. Es war daher erforderlich, ein neues Gerinnungsprotokoll zu entwickeln.

Da die Ergebnisse der geplanten Sonothrombolyseversuche wesentlich von der Beschaffenheit des untersuchten Thrombus abhängig sind, wurden vier Kriterien aufgestellt, denen der Thrombus bzw. das zu erstellende Gerinnungsprotokoll genügen müssen:

- Die Thromben müssen stabil genug sein, um physiologischen Flussgeschwindigkeiten standzuhalten. Nur solche Thromben können auch klinisch zur Ausbildung einer manifesten zerebralen Durchblutungsstörung führen.
- Das zu erstellende Gerinnungsprotokoll muss physiologisch begründbar sein.
- Die generierten Thromben sollen mit *in vivo* entstandenen Thromben histologisch vergleichbar sein.
- Schließlich soll das Gerinnungsprotokoll einfach und kostengünstig und somit durch möglichst viele andere Arbeitsgruppen leicht reproduzierbar sein.

Aufgrund der beiden ersten Punkte ist es notwendig, die wesentlichen Zusammenhänge der Hämostase noch einmal kurz zu rekapitulieren. Eine Übersicht über die komplexen Interaktionen im Verlauf der Hämostase, in deren Mittelpunkt wiederholt die Thrombozyten stehen, liefert Abbildung 3.12.

Für eine physiologische Hämostase und die Bildung eines stabilen Blutgerinnsels müssen sowohl Blutplasma als auch die korpuskulären Blutbestandteile, insbesondere die Thrombozyten, in ausreichendem Maße vorhanden sein.

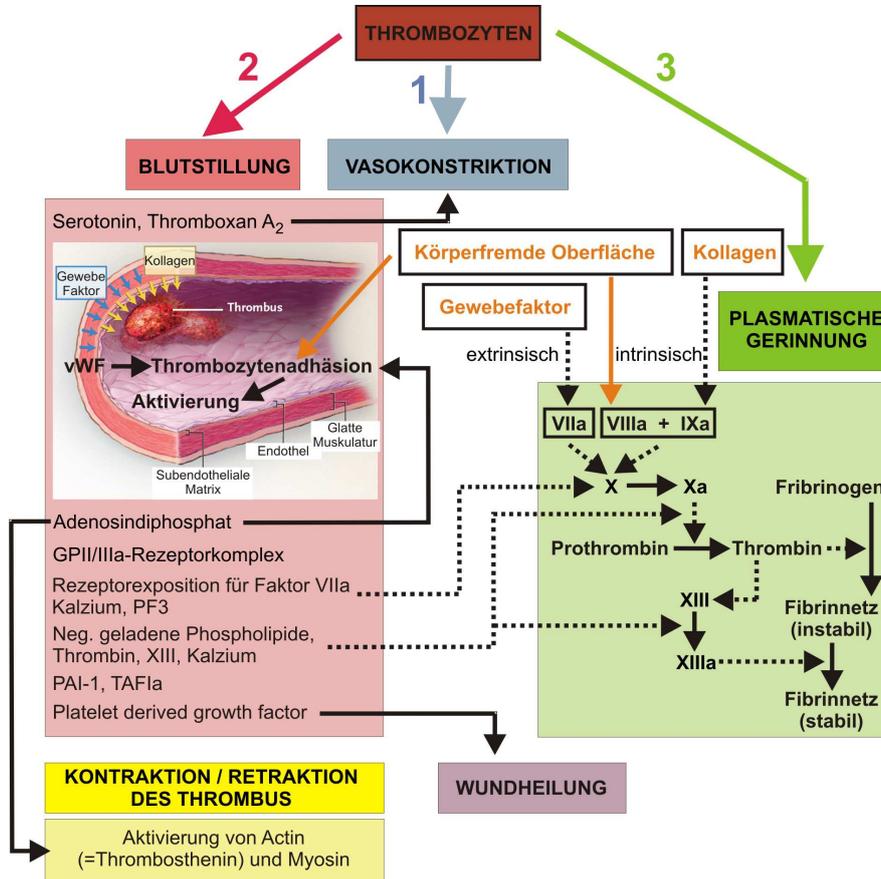


Abb. 3.12.: Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Hämostase. Die Thrombozyten sind in alle drei Schritte der Hämostase involviert. Aus den aktivierten Thrombozyten werden Hormone ausgeschüttet, die für die Auslösung einer Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes mitverantwortlich sind (1. Schritt der Hämostase). Die primäre Blutstillung (2. Schritt der Hämostase) wird durch eine zunehmende Adhäsion von Thrombozyten erreicht. Durch die Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und schütten verschiedene Stoffe aus, die zum einen eine weitere Thrombozytenaggregation und zum anderen den Prozess der plasmatischen Gerinnung (3. Schritt der Hämostase) unterstützen. Kontraktile Elemente innerhalb der Thrombozyten schließen den Gerinnungsprozess mit einer Kontraktion und Retraktion des entstandenen roten Thrombus ab. *In vivo* wird die Hämostase durch Kollagen und Gewebefaktor ausgelöst. Unter *in vitro* Bedingungen stoßen körperfremde Oberflächen diesen Prozess an. (Die Darstellung des Gefäßabschnitts wurde einer Arbeit von Furie [24] entnommen und modifiziert.)

Im Plasma müssen funktionstüchtige Faktoren der plasmatischen Gerinnung vorliegen. Für die Auslösung der extrinsischen Gerinnungskaskade ist eine Interaktion zwischen Blut und Gewebefaktor (t-PA) und für die Aktivierung der intrinsischen Gerinnung ein Kontakt zwischen Blut und Kollagen oder körperfremden Oberflächen erforderlich.

Durch den direkten oder indirekten Kontakt der Thrombozyten zu subendothelialelem Gewebe, insbesondere zu Kollagen, kommt es zu einer Adhäsion der Blutplättchen am Ort der Endothelverletzung. Die Verbindung zwischen der verletzten Gefäßwand und den Thrombozyten wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) hergestellt, der sowohl von den Endothelzellen gebildet wird als auch in den Granula der Thrombozyten gespeichert ist. Der vWF bindet an die freigelegten Proteine der Gefäßwand und an den Glykoproteinkomplex Ib/IX an der Thrombozytenoberfläche. Anstatt der verletzten Gefäßwand können bei *in vitro* Versuchen auch körperfremde Oberflächen zu einer Anheftung der Thrombozyten führen.

Die Adhäsion der Thrombozyten führt zu deren Aktivierung. Thrombozytenadhäsion und -aktivierung werden unter dem Begriff der primären Blutstillung zusammengefasst und bilden den zweiten Schritt der Hämostase. Der erste Schritt der Hämostase, die Vasokonstriktion des verletzten Gefäßes, wird durch die Mediatoren Serotonin und Thromboxan-A₂ vermittelt, die aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden. Die an der verletzten Gefäßwand angelagerten und aktivierten Thrombozyten setzen Adenosindiphosphat (ADP) frei, wodurch eine weitere Thrombozytenaggregation ausgelöst wird. Mit der Entstehung eines Thrombozytenpfropfs, dem sogenannten weißen Abscheidungsthrombus, ist der Prozess der primären Blutstillung abgeschlossen.

Die aktivierten Thrombozyten spielen auch im 3. Schritt der Hämostase, der plasmatischen Gerinnung, die auch sekundäre Blutstillung genannt wird, eine maßgebliche Rolle: Die aktivierten Thrombozyten setzen Plättchenfaktor 3 (PF3) und Kalzium frei. Gleichzeitig kann sich an ihrer Oberfläche der Faktor VIIa, der Bestandteil des extrinsischen Gerinnungssystems ist, binden. Mit Hilfe des so entstandenen Komplexes aus Faktor VIIa, PF3 und Kalzium, wird Faktor X und somit die restliche plasmatische Gerinnungskaskade über das extrinsische System lokal aktiviert. Über die Freisetzung von PF3 und Kalzium unterstützen die aktivierten Thrombozyten außerdem die Bildung eines Komplexes aus PF3, Kalzium, Faktor VIIIa und IXa. Auf diese Weise wird ebenfalls der Faktor X aktiviert, dieses Mal jedoch über das intrinsische Gerinnungssystem. Über den Faktor X laufen extrinsisches und intrinsisches Gerinnungssystem zu einer gemeinsamen Endstrecke zusammen. Auch diese Endstrecke der plasmatischen Gerinnung wird durch die aktivierten Thrombozyten unterstützt, indem sie verschiedene Gerinnungsfaktoren, wie die Protease Thrombin und den Faktor XIII,

Kalzium und negativ geladene Phospholipide freisetzen. Das Endprodukt der plasmatischen Gerinnung ist ein Fibrinnetz, das an dem GPII/IIIa-Rezeptorkomplex der aktivierten Thrombozyten andockt und sich so zwischen den Thrombozyten aufspannen kann. In dem Netz fangen sich Erythrozyten, so dass ein sogenannter roter Thrombus entsteht (Abb.3.13). Die Verbindung zwischen aktivierten Thrombozyten und einem widerstandsfähigen Fibrinnetz ist grundlegend für die Festigkeit des Blutgerinnsels.

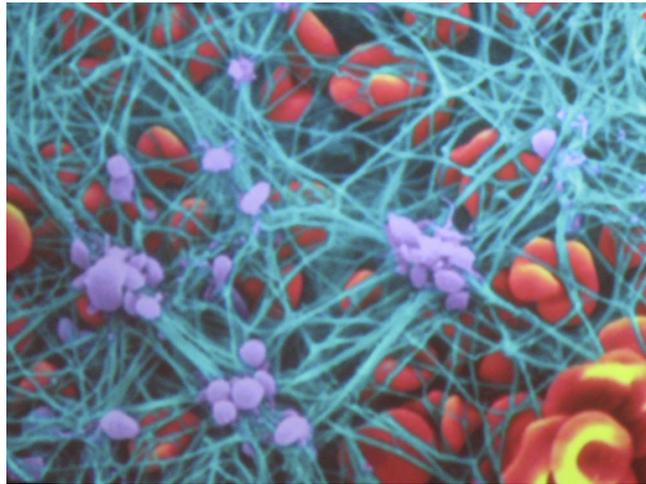


Abb. 3.13.: Modifizierte elektronenmikroskopische Darstellung des Fibrinnetzes in einem Blutgerinnsel. Das türkis dargestellte Fibrinnetz ist zwischen den blau gefärbten Thrombozyten aufgespannt. In dem Netz finden sich vereinzelte und in Gruppen zusammenliegende rote Erythrozyten. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung einer Arbeit von Herrn Professor Alexandrov entnommen [2].

Das Fibrinnetz wird durch die Entstehung kovalenter Bindungen zwischen α - und γ -Ketten benachbarter Fibrinmonomere stabilisiert [24]. Durch die Ausbildung kovalenter Verbindungen zwischen dem Fibrinpolymer und α_2 -Plasmininhibitor und die Einfügung des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) in das Gerinnsel, wird dieses besser vor einer Proteinspaltung geschützt [42]. Ein Teil des PAI-1 stammt aus den aktivierten Thrombozyten.

Thrombin-aktivierter-Fibrinolyse-Inhibitor (TAFIa) ist eine Carboxypeptidase, die an Orten mit einer hohen Thrombinkonzentration durch die aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet wird. Durch die Spaltung von endständigen Lysinbausteinen, an die sich Plasminogen und Plasmin binden können, führt TAFIa zu einer weiteren Modifizierung des Fibrinpolymers, das so zunehmend gegen eine Fibrinolyse geschützt wird [42].

Schließlich kommt es durch die kontraktile Proteine Actin (oder auch Thrombosthenin) und Myosin, die sich in den Thrombozyten befinden, zu einer Kontraktion und

Retraktion des Blutgerinnsels. Das Ergebnis ist ein fester Fibrinthrombus. Außerdem wird der platelet derived growth factor (PDGF) aus den aktivierten Thrombozyten freigesetzt, der auf Granulozyten, Makrophagen und Fibroblasten chemotaktisch wirkt, diese aktiviert und so zur Wundheilung beiträgt.

Die Thrombozyten spielen also auf allen Ebenen der Hämostase eine zentrale Rolle und sind darüber hinaus unentbehrlich für die Stabilität des Thrombus in Strömungen mit hoher Schergeschwindigkeit [24]. Dieser Umstand muss in dem zu erstellenden Gerinnungsprotokoll berücksichtigt werden.

Idealerweise sollten die Thromben aus einem Gerinnungsprozess hervorgehen, der in strömendem Vollblut unter physiologischen Druck- und Scherbelastungen stattgefunden hat. Durch den Fahraeus-Lindquist-Effekt kommt es in den Blutgefäßen zu einer Umverteilung der zellulären Bestandteile. An der Grenzschicht zwischen strömendem Blut und Blutgefäßwand findet sich eine erhöhte Konzentration der kleinsten Blutzellen, der Thrombozyten, während die großen Blutzellen in der Mitte der Strömung treiben. Auf diese Weise erhalten die Thrombozyten schnell Kontakt zu verletzten Gefäßwänden und können ihre Aufgabe als „Wächter des Endothels“ erfüllen. Physiologisch entstandene Gerinnsel weisen daher auch einen hohen Anteil von Thrombozyten und einen geringen Anteil von Erythrozyten innerhalb des Fibrinnetzes auf.

Der entscheidende Punkt unseres Gerinnungsmodells ist daher die Verwendung von plättchenreichem Plasma (PRP) anstelle von Vollblut. Auf diese Weise soll der zentralen Bedeutung und der hohen Konzentration der Thrombozyten in arteriell entstandenen Blutgerinnseln Rechnung getragen werden, ohne die Gerinnung in strömendem Blut ablaufen zu lassen, was technisch wesentlich aufwendiger wäre.

Die einzelnen Schritte des verwendeten Gerinnungsprotokolls lassen sich wie folgt beschreiben:

- Im Rahmen des Blutspendeprogramms des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck wird gesunden Personen, die keine blutgerinnungshemmenden Substanzen einnehmen und die gleiche Blutgruppe haben, jeweils 8 - 10 ml venöses Blut entnommen. Die Blutabnahme ist durch die Ethikkommission des UKSH genehmigt und wird durch Mitarbeiter der Klinik für Transfusionsmedizin durchgeführt. Das venöse Vollblut wird in Citratröhrchen

gesammelt (S-Monovette , REF 02.1067.001; Sarstedt, 51588 Nümbrecht, Deutschland) und anschließend gepoolt, um interindividuelle Unterschiede bezüglich der Gerinnungseigenschaften sowie der Zusammensetzung des Bluts zu vermeiden. Die Endkonzentration der Tri-Natriumcitratlösung in den blutgefüllten Röhrchen beträgt 10.6 mmol/l.

- Nach zehnminütiger Zentrifugation des Citratbluts bei 180g (Multifuge[©] 1S-R; Heraeus Holding GmbH, 63450 Hanau, Deutschland) werden 3.5 ml PRP durch Aspiration des Überstandes gewonnen.
- Um einen gewissen Erythrozytenanteil innerhalb des Thrombus zu gewährleisten, wird das PRP mit 0.5 ml der Grenzschicht vermischt, die sich zwischen dem Überstand und der Erythrozytenschicht befindet.
- Die Gerinnung wird durch eine Rekalzifizierung des Gemischs (CaCl_2 -Endkonzentration = 13.8 mmol/l) in sterilen Plastikröhrchen (REF 55.468.001; Sarstedt, 51588 Nümbrecht, Deutschland) ausgelöst.
- Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 37°C für eine Dauer von 2 Stunden.

Der zeitliche Ablauf des Gerinnungsprozesses und ein daraus entstandener, typischer Thrombus sind in Abbildung 3.14 zu sehen.

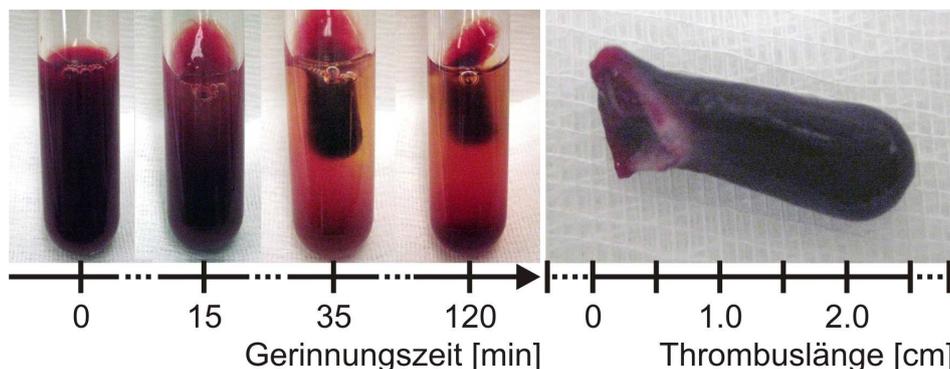


Abb. 3.14.: Gerinnungsprozess und generierter Thrombus. Zu sehen ist die nach rund einer halben Stunde einsetzende Kontraktion des Blutgerinnsels. Die gewonnenen roten Thromben zeichnen sich durch eine gummiartige Konsistenz und hohe Formstabilität aus.

Zur Durchführung der Lyseexperimente musste auch Blutplasma gewonnen werden. Dazu wurde venöses Vollblut, das die gleiche Blutgruppe wie die erzeugten Thromben hat, für 10 Minuten bei 2570g zentrifugiert (EBA 8S, Hettich GmbH & Co.KG, 78532 Tuttlingen, Deutschland) und das überstehende Plasma anschließend abpipettiert.

Zusammenfassung:

In diesem Kapitel wurden der Aufbau und die Funktionsweise des entwickelten Modells vorgestellt. Die Bestimmung der Thrombolyse basiert auf einer zeitkontinuierlichen Messung der Druckdifferenz, die über einem Korb anliegt, in dem sich der zu untersuchende Thrombus befindet. Verändert sich das Thrombusvolumen, kommt es zu einer Änderung des hydrodynamischen Widerstands des Thrombus und somit zu einer messbaren Änderung der Druckdifferenz am Thrombuskorb.

Der Thrombuskorb befindet sich in einem Schlauchsystem mit einer pulsatil strömenden Blutersatzlösung, die von einer computergesteuerten Pumpe angetrieben wird. Durch eine definierte Einstellung der Modellparameter lassen sich physiologische Fluss- und Druckverhältnisse kurz vor dem eingesetzten Thrombus erzeugen, die mit den hämodynamischen Verhältnissen im C1-Segment der A. carotis interna übereinstimmen.

Zur Herstellung des Thrombus wird als wesentlicher Bestandteil plättchenreiches Plasma aus humanem Vollblut verwendet.

Durch die Wahl der Messgröße, die Konstruktion des Versuchstandes und das spezielle Gerinnungsprotokoll konnten bereits einige Anforderungen erfüllt werden, die an den experimentellen Aufbau gestellt wurden:

Das Modell ist in der Lage, unter pulsatilen Strömungsverhältnissen zeitkontinuierlich und kontaktfrei Messdaten zu erheben, die mit der zu bestimmenden Thrombolyse in einem proportionalen, streng monotonen Verhältnis stehen.

Die Versuchsanordnung ermöglicht den uneingeschränkten Einsatz von thrombolytischen Substanzen und gewährleistet eine kostengünstige und zeitsparende Versuchsdurchführung, da bis auf die eingesetzten thrombolytischen Stoffe und die Blutersatzflüssigkeit keine Verbrauchsmaterialien zu ersetzen und bis auf die Generierung des Thrombus keine weiteren Vorbereitungen zu treffen sind.

Die Konstruktion des Thrombuskorbes und die Wahl des Gerinnungsprotokolls erfolgten unter physiologischen Gesichtspunkten.

Inhalt des folgenden Kapitels wird die detaillierte Analyse des beschriebenen Messplatzes sein.

4. Experimentelle Analyse des Messstandes

In diesem Kapitel soll das Lübecker Flussmodell physikalisch genauer untersucht und vor allem in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Messungen und mögliche Fehlerquellen evaluiert werden. Außerdem erfolgt eine Analyse der generierten Thromben hinsichtlich ihres histologischen Erscheinungsbildes und ihres mechanischen Verhaltens innerhalb des Messplatzes.

4.1. Untersuchungen zur generierten Flussgeschwindigkeit

Das entwickelte Verfahren zur zeitkontinuierlichen und kontaktfreien Bestimmung der Thrombolysen basiert auf der Messung der Druckdifferenz, die über dem Thrombus abfällt. Nach dem Ohm'schen Gesetz hängt diese Druckdifferenz nicht allein von der Größe und damit vom hydrodynamischen Widerstand des Thrombus ab, sondern auch von der Flussgeschwindigkeit der zirkulierenden Flüssigkeit. Für das Gelingen der Versuche ist deshalb eine definierte Einstellung und zuverlässige Messung der Flussgeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dreier Versuche vorgestellt, mit denen diese Voraussetzungen überprüft wurden.

Die Validierung des eingesetzten Laufzeitdifferenzmessers (vgl. Abschn. 3.2) erfolgte durch eine volumetrische Messung. An der Pumpe wurden 10 unterschiedliche Flussgeschwindigkeitswerte eingestellt und durch den Laufzeitdifferenzmesser über eine Dauer von 5 Minuten mit einer Taktrate von 1 Hz gemessen. Der Mittelwert dieser Flussge-

schwindigkeitsmessung V_L wurde dann mit der Flussgeschwindigkeit V_V verglichen, die sich rechnerisch aus der gesammelten Flüssigkeitsmenge (Ausliterung) und dem Querschnitt des durchströmten Schlauchsystems ergab. Die Flussgeschwindigkeitsmessung mit dem Laufzeitdifferenzmesser liefert geringfügig kleinere Werte als die volumetrische Bestimmung (Abb. 4.1). In dem Flussgeschwindigkeitsbereich von 0 bis 95 cm/s ist der relative Fehler dabei stets kleiner als 0.04 % (maximaler absoluter Fehler: 0.106 cm/s).

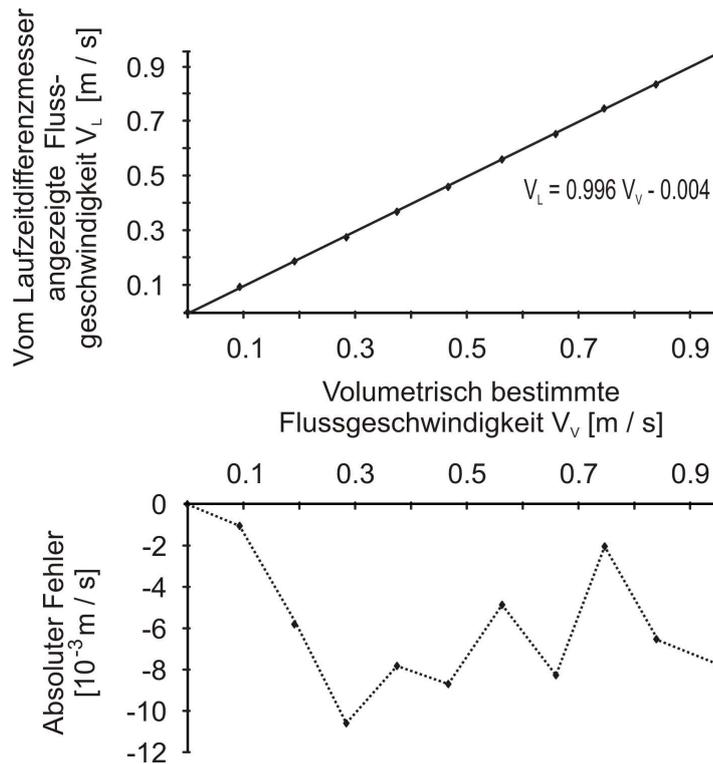


Abb. 4.1.: Genauigkeit der Flussgeschwindigkeitsmessung. Vergleich der durch Laufzeitdifferenzmessung V_L und Ausliterung V_V bestimmten Flussgeschwindigkeiten (oben) und Auftragung des absoluten Fehlers der Laufzeitdifferenzmessung in Bezug auf die volumetrisch ermittelten Werte (unten).

In einem zweiten Experiment wurde untersucht, inwieweit sich die an der Pumpe eingestellten Flussgeschwindigkeiten durch eine Erhöhung des Flusswiderstandes im Schlauchsystem beeinflussen lassen. Dazu wurde die Flussgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Füllungszuständen des Thrombuskorbes für jeweils eine Minute durch den Laufzeitdifferenzmesser mit einer Samplingrate von 1 Hz aufgezeichnet und die erfassten Daten anschließend gemittelt. Um eine Veränderung des Flusswiderstandes ausschließen zu können, wurde der Hohlraum des Thrombuskorbes sukzessive mit passgenauen Scheiben aus Polyoxymethylen (vgl. Abschn. 3.3) ausgefüllt. Für 5 eingestellte Flussgeschwindigkeiten aus dem Wertebereich 0 bis 95 cm/s wurden so jeweils 6 Mes-

sungen mit Füllungszuständen zwischen 0 und 100 % durchgeführt (Abb. 4.2). Trotz zunehmender Flusswiderstände verhalten sich selbst hohe Flussgeschwindigkeiten ausreichend stabil. Der relative Fehler, der sich bei einem Vergleich der Flussgeschwindigkeitsmittelwerte der einzelnen Füllungszustände ergibt, ist für alle untersuchten Flussgeschwindigkeiten kleiner als 0.8 %.

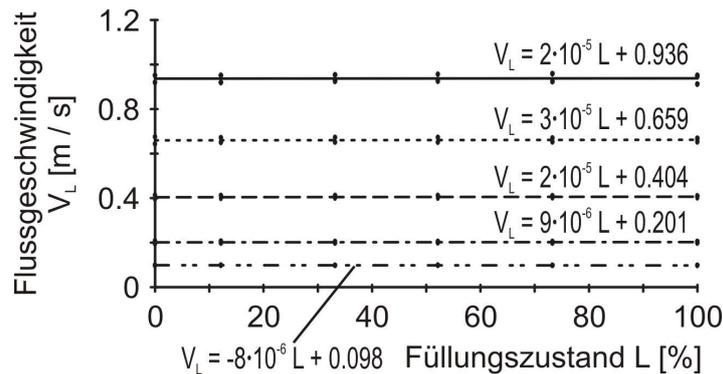


Abb. 4.2.: Konstanz der eingestellten Flussgeschwindigkeit bei variablem Flusswiderstand. Nach Einstellung unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten an der Pumpe wurden die Flussgeschwindigkeitsmittelwerte V_L aus den einminütigen Messungen des Laufzeitdifferenzmessers bestimmt, die sich unter einem schrittweise zunehmenden Füllungszustand L , und somit schrittweise erhöhten Flusswiderstand des Thrombuskorbes ergaben.

Im dritten Experiment wurde die zeitliche Konstanz der eingestellten Flussgeschwindigkeit überprüft. Über jeweils 4 Stunden wurden mittels Laufzeitdifferenzmessung (Samplingrate: 1Hz) die Flussgeschwindigkeitswerte für zwei unterschiedliche Flussgeschwindigkeitseinstellungen gesammelt und über die Zeit aufgetragen (Abb. 4.3).

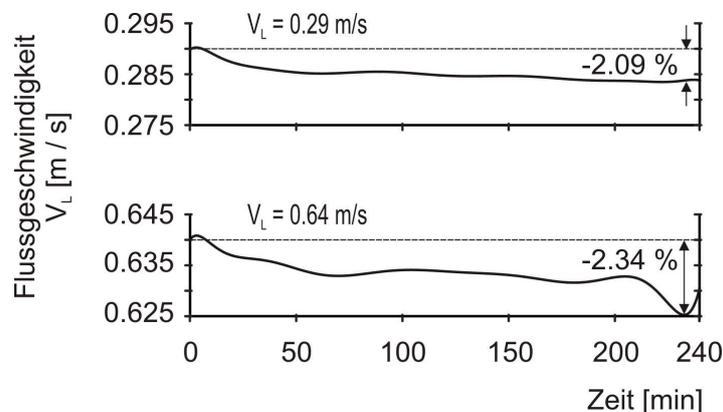


Abb. 4.3.: Zeitliches Verhalten der Flussgeschwindigkeit. Dargestellt ist der vierstündige Verlauf der gemessenen Flussgeschwindigkeit für einen niedrigen und einen hohen Flussgeschwindigkeitswert. Die Widerstandsbelastung des Systems war dabei konstant.

Die beiden Flussgeschwindigkeiten, die an der Pumpe eingestellt wurden, entsprechen dabei dem Maximum (64 cm/s) und Minimum (29 cm/s) der Flussgeschwindigkeitskurve, die zur Generierung der pulsartigen Strömung im Lyseexperiment (Kap. 5) verwendet wird. Der Thrombuskorb war in beiden Versuchen komplett mit Polyoxymethylen (POM) ausgefüllt, um eine möglichst hohe und gleichzeitig konstante Widerstandsbelastung des Systems zu garantieren.

In beiden Messungen zeigte sich eine leichte Abnahme (Drift) der aufgezeichneten Flussgeschwindigkeit. Zusätzlich wurde am Ende der Aufzeichnung für die mit 64 cm/s höher eingestellte Flussgeschwindigkeit eine Schwankung der Flussgeschwindigkeit nachgewiesen. Innerhalb des gesamten zeitlichen Verlaufs der beiden Messungen betrug die maximale Abweichung 2.34 %. In beiden Versuchen traten die größten Flussgeschwindigkeitsänderungen jeweils zu Beginn der Messungen auf. Als gemeinsame Ursache für Flussgeschwindigkeitsdrift und -schwankung kommt eine Drehzahländerung der Pumpe in Betracht. Die Drift kann außerdem durch eine langsame Erwärmung und entsprechende Aufweitung des Schlauchsystems bedingt sein .

Obgleich diese Effekte klein zu sein scheinen, könnten sie die gemessenen Druckdifferenzwerte im Verlauf eines Lyseexperiments verfälschen. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, erfolgt eine sogenannte Driftbereinigung . Dazu wird für jede Druckdifferenzmessung, die im Rahmen eines Versuchs mit einem Thrombus stattfindet, eine weitere Druckdifferenzmessung unter den gleichen hydrodynamischen Rahmenbedingungen durchgeführt, wobei sich im Thrombuskorb POM befindet. Aus diesen zusätzlichen Druckdifferenzdaten kann die zeitliche Änderung der Druckdifferenz innerhalb des Systems berechnet werden, die sich nicht auf eine Veränderung des Thrombus zurückführen lässt. Diese Druckdifferenzänderung wird dann als Offset von den Daten des eigentlichen Experiments abgezogen (vgl. Abschn. 4.6.2).

4.2. Untersuchungen zur Druckmessung

Die entscheidende Messgröße des vorgestellten Modells ist die über dem Thrombuskorb anliegende Druckdifferenz. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Genauigkeit der verwendeten Drucksensoren zu kennen.

Die Überprüfung der von den Sensoren angegebenen Druckwerte erfolgte mit Hilfe eines Quecksilbermanometers. Zur Druckerzeugung diente eine luftdicht abgeschlossene Metallkammer, deren Volumen stufenlos über ein Drehgewinde verstellt werden konnte. Die Metallkammer war über starre Rohre mit dem Quecksilbermanometer und den beiden Drucksensoren verbunden. Eingestellt wurden Druckwerte zwischen 0 und 200 mmHg, wobei in einer Versuchsreihe als Ausgangswert der einzelnen Einstellungen immer der Wert 0 und in einer zweiten Versuchsreihe immer der Wert 200 mmHg gewählt wurde. Beide Versuchsreihen wurden über eine Dauer von 4 Stunden¹ alle 20 Minuten wiederholt. Insgesamt wurden durch zwei unabhängig voneinander agierende Untersucher 1008 Wertepaare erfasst. Ein Untersucher stellte die Druckwerte in wechselnder Reihenfolge am Manometer ein, der andere las die von den Sensoren angegebenen Werte ab. Auf diese Weise sollte eine Beeinflussung der Ergebnisse vermieden werden.

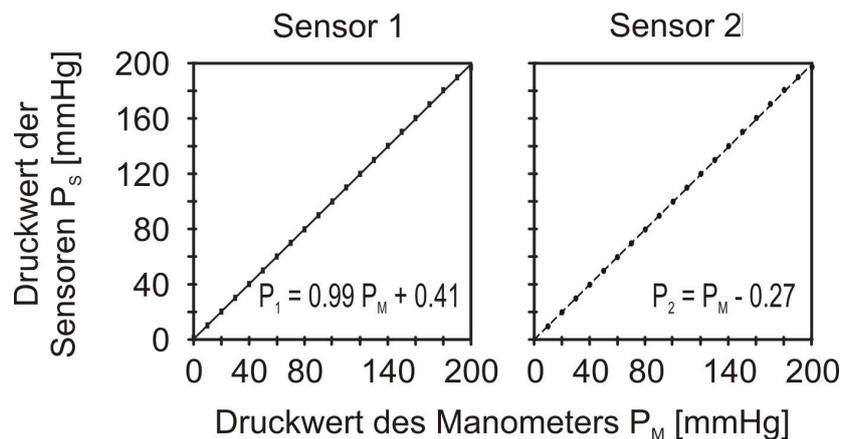


Abb. 4.4.: Genauigkeit der einzelnen Drucksensoren. Die von den Sensoren angezeigten Druckwerte sind über die am Quecksilbermanometer eingestellten Druckwerte aufgetragen. Jedes Wertepaar wurden 24 mal bestimmt. Zu sehen sind die Mittelwerte der Messungen. Die Standardabweichungen der Messungen liegen zwischen 0 und 0.5 mmHg und sind deshalb in der gewählten Auflösung nicht mehr zu sehen.

Die von den Sensoren angegebenen Druckwerte zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den am Manometer abgelesenen Werten (Abb. 4.4). Die Genauigkeit der Sensoren ist dabei unabhängig vom gewählten Ausgangsdruck. Es findet sich keine Hysterese. Über den zeitlichen Verlauf der wiederholten Messungen lässt sich jedoch eine Drift der Sensoren bei Einstellung der gleichen Manometerwerte feststellen (Abb. 4.5). Diese zeitliche Änderung der Druckwerte ist jedoch äußerst gering und drei Zehnerpotenzen

¹Der Test wurde 4 Stunden lang durchgeführt, weil die Druckmessung im Rahmen der geplanten Experimente ebenfalls 4 Stunden dauert.

kleiner als die eigentliche Messgröße. Untersucht man die Abhängigkeit dieser Drift von den anliegenden Druckwerten (Regressionsgeraden in Abb. 4.5), so stellt sich heraus, dass sich beide Sensoren bezüglich ihres Driftverhaltens parallel verhalten. Je kleiner die Druckbelastung, desto größer die zeitliche Drift hin zu größer gemessenen Druckwerten. Mit steigender Druckbelastung kehrt sich das Vorzeichen der Drift um und die Sensoren messen im Verlauf immer kleinere Werte für den gleichen Manometerdruck. Da es in den Experimenten auf die Druckdifferenz zwischen den beiden Sensoren ankommt, heben sich die ohnehin geringen Messfehler der beiden Sensoren größtenteils auf.

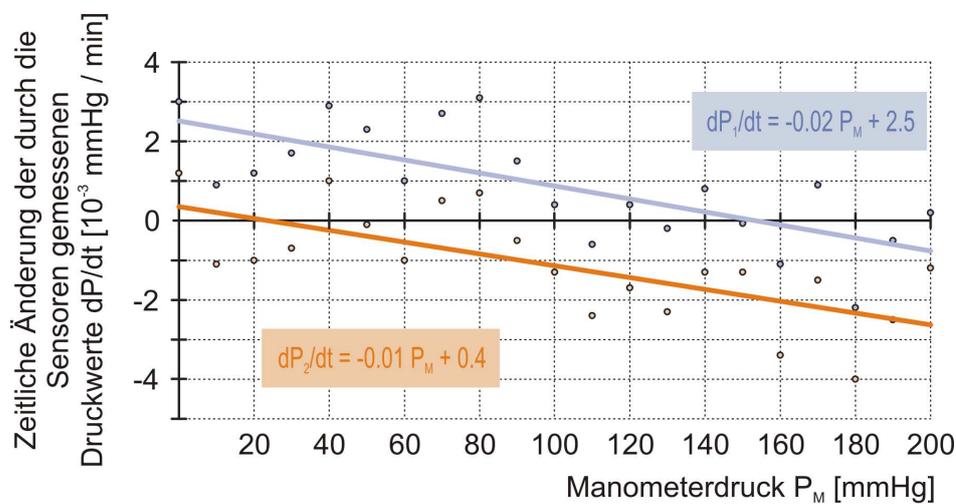


Abb. 4.5.: Zeitliche Änderung der an den Sensoren gemessenen Druckwerte in Abhängigkeit von den eingestellten Manometerdruckwerten. Idealerweise sollten die Sensoren immer den gleichen Wert anzeigen, wenn wiederholt der gleiche Manometerdruck eingestellt wird. Im optimalen Fall sollten also alle Punkte der Grafik bei dem Wert 0 liegen. Je nach eingestelltem Manometerdruck zeigen jedoch die beiden benutzten Sensoren ein sehr geringes Driftverhalten. Für Sensor 1 (blau) ergibt sich bei einem anliegenden Druck von 80 mmHg die stärkste Drift (0.003 mmHg/min). Das bedeutet für eine vierstündige Versuchsdauer eine Abweichung um 0.72 mmHg (rel. Fehler = 0.9 %). Für Sensor 2 (orange) liegt die größte Drift bei einer Druckbelastung von 180 mmHg vor. Hier ergibt sich eine Abweichung von rund 1.0 mmHg bei einer vierstündigen Messung (rel. Fehler = 0.5 %).

Der absolute Fehler der über die Sensoren berechneten Druckdifferenz ist deshalb auch sehr klein (Abb. 4.6). Mit zunehmender Höhe des anliegenden Drucks verringert sich die gemessene Druckdifferenz zwischen den beiden Sensoren und wechselt ungefähr bei 150 mmHg das Vorzeichen. Der absolute Fehler der Druckdifferenz war im gesamten untersuchten Druckbereich stets kleiner als 1 mmHg. Im versuchstechnisch relevanten Druckbereich sind die Abweichungen der beiden Sensoren am geringsten und liegen unter 0.4 mmHg. Entsprechend der bereits erwähnten zeitlichen Drift der beiden Sensoren

kommt es auch bei der Bestimmung der Druckdifferenz zu einer geringen Verschiebung mit zunehmender Dauer des Versuchs hin zu höheren positiven Werten. Dies zeigen die farbigen Kurven in Abbildung 4.6, bei denen es sich um einzelne Versuchsreihen zu unterschiedlichen Versuchszeiten handelt. Im Verlauf eines Experiments ist also mit einem leichten Trend hin zu zunehmenden Druckdifferenzwerten zu rechnen. Theoretisch führt dies zu einer Unterschätzung der Thrombolyse. Praktisch gesehen ist dieser Trend jedoch betragsmäßig zu vernachlässigen und wirkt zudem auch noch der im Abschnitt 4.1 erwähnten Flussgeschwindigkeitsdrift entgegen.

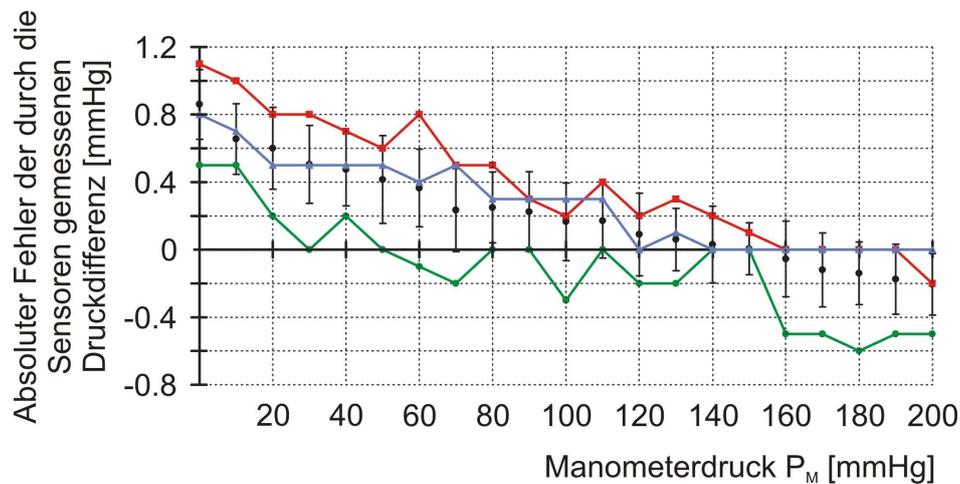


Abb. 4.6.: Absoluter Fehler der zwischen den Sensoren herrschenden Druckdifferenz. Aufgetragen ist die Druckdifferenz zwischen den beiden Sensoren über die an beiden Sensoren anliegende Druckbelastung. Im optimalen Fall sollte sich stets ein Wert von 0 ergeben. Über den gesamten Druckbereich sind die Fehler jedoch gering. In dem für die Experimente interessanten Druckbereich (60 - 200 mmHg) ist der absolute Fehler im Mittel stets kleiner als 0.4 mmHg. Die Gesamtheit aller erhobenen Daten ist in schwarz unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung abgebildet. Als Subgruppen sind die Messungen zum Zeitpunkt $t=0$, 120 und 240 min noch einmal separat in den Farben Grün, Blau bzw. Rot dargestellt. Diesen Kurven ist die Veränderung der gemessenen Druckdifferenzfehler über die Dauer eines Experiments von 4 Stunden zu entnehmen.

Es bleibt zu erwähnen, dass die Elektronik der Sensoren technisch bedingt nur auf 0.2 mmHg genau ist und auch der Einstellung am Manometer optische Grenzen gesetzt sind (Ablesegenauigkeit ca. 0.5 mmHg). Die hier erhobenen Fehler gehen also bereits im Systemrauschen unter. Schließlich ist zu beachten, dass die Sensoren vor jeder Messung neu geeicht werden. Der Betrag der in diesem Abschnitt vorgestellten Fehler wird sich also von Versuch zu Versuch ändern. Die qualitative Aussage der hier durchgeführten Fehlerbestimmung behält jedoch weiterhin ihre Gültigkeit.

4.3. Hydrodynamische Beschreibung des Thrombuskorbes

In Abschnitt 3.3 wurden die Geometrie und Funktionsweise des Thrombuskorbes sowie sein physiologisches Äquivalent erläutert. In diesem Abschnitt sollen die hydrodynamischen Eigenschaften des Thrombuskorbes experimentell beschrieben, die dazugehörigen physikalischen Gleichungen abgeleitet und die an den Korb gestellten und bislang noch nicht als erfüllt nachgewiesenen Anforderungen überprüft werden.

In Abhängigkeit vom Füllungszustand des Thrombuskorbes L und von der Flussgeschwindigkeit der zirkulierenden Blutersatzlösung V wurde dazu der Strömungswiderstand R des Thrombuskorbes nach dem Ohm'schen Gesetz aus der gemessenen Druckdifferenz ΔP , der durchströmten Querschnittsfläche des Laufzeitdifferenzmessers und der dort gemessenen Flussgeschwindigkeit der Blutersatzlösung berechnet.

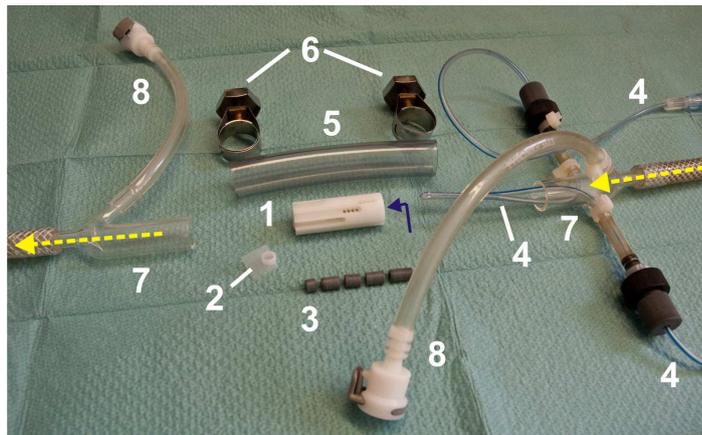


Abb. 4.7.: Einzelteile und Anschlüsse des Thrombuskorbes. Zu sehen sind die Bestandteile des Versuchsaufbaus, die zur Erstellung der Kennlinien des Thrombuskorbes vor jeder einzelnen Messung neu zusammengesetzt wurden, um die Reproduzierbarkeit der Messmethode zu überprüfen. Zunächst wird der Thrombuskorb (1) an seinem distalen Ende mit der Gazeplatte (2) verschlossen, bevor die POM-Zylinder (3) in den Hohlraum des Korbes eingesetzt werden (blauer Pfeil). Anschließend werden die Zuleitungen für das Thrombolytikum (4) in den Korb geschoben. Der präparierte Korb wird in den Hüllschlauch (5) gedrückt und mit Schlauchschellen (6) an den gläsernen Anschlussrohren (7) des Schlauchsystems befestigt. Dargestellt sind weiterhin die Verbindungsschläuche zu den Drucksensoren (8) und die Fließrichtung der Blutersatzflüssigkeit bei Inbetriebnahme des Modells (gelbe Pfeile).

Für jede Kombination aus Füllungszustand und Flussgeschwindigkeit wurden drei Druckdifferenzmessungen von jeweils 3 Minuten Länge durchgeführt. Vor jeder einzelnen Messung wurde der Thrombuskorb aus dem Versuchsaufbau entnommen und

der in seine Einzelteile zerlegte Versuchsaufbau wieder neu zusammengesetzt (vgl. Abb. 4.7). Auf diese Weise sollte die Durchführung völlig unabhängiger Messungen garantiert und eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der erhobenen Daten ermöglicht werden. Um konstante Untersuchungsbedingungen zu gewährleisten, wurde POM (vgl. Abschn. 3.3) als Füllmaterial verwendet. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4.8 in Form von charakteristischen Kennlinien des Thrombuskorbes aufgetragen.

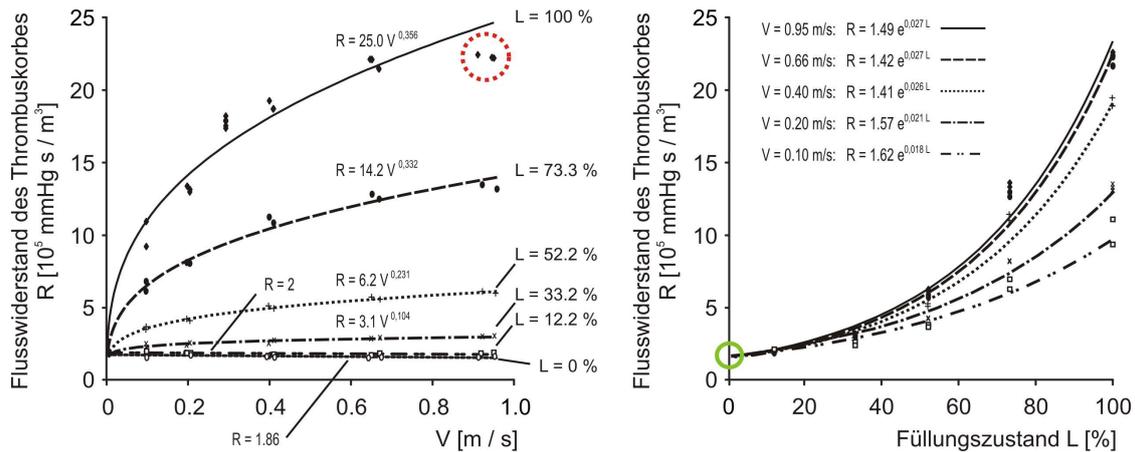


Abb. 4.8.: Kennlinien des Thrombuskorbes. Dargestellt sind die empirisch ermittelten Beziehungen zwischen dem hydrodynamischen Flusswiderstand des Thrombuskorbes R und der Flussgeschwindigkeit der zirkulierenden Blutersatzlösung V bzw. dem Füllungsgrad des Thrombuskorbes L . Der Eigenwiderstand des Thrombuskorbes wird durch einen grünen Kreis, die durch störende Seitenflüsse veränderten Messwerte werden durch einen rotgepunkteten Kreis hervorgehoben.

Zunächst lässt sich den Kurven entnehmen, dass sich die gemessenen Daten trotz wiederholter Demontage des Messplatzes sehr gut reproduzieren lassen. Damit ist die Vergleichbarkeit separat durchgeführter Untersuchungen gewährleistet.

Der Eigenwiderstand des Thrombuskorbes wird in der linken Grafik durch die Gerade repräsentiert, die beim Füllungsgrad $L = 0$ gemessen wurde. Wie zu erwarten, ist er unabhängig von der Flussgeschwindigkeit der Blutersatzflüssigkeit. In der rechten Grafik ergibt sich entsprechend ein Punkt. Der Wert des Eigenwiderstands ist mit $1.86 \cdot 10^5 \text{ mmHg s/m}^3$ deutlich kleiner als die Strömungswiderstände, die bei höheren Füllungsgraden gemessen werden. Wie in Abschnitt 3.3 gefordert, lässt sich also der hydrodynamische Zustand eines thrombusbeladenen Korbes gut von dem eines unbeladenen Korbes differenzieren.

Allerdings lassen sich bei hohen Flussgeschwindigkeiten Füllungsgrade unter 20% nicht mehr unterscheiden. Dieser Nachteil ist der Preis für eine vergleichsweise hohe

messtechnische Auflösung geringer Lyseraten. Da aufgrund klinischer Erfahrungen eher mit einer inkompletten Auflösung des Thrombus im Zuge der Thrombolyse gerechnet werden muss [65], ist vorerst nur die hohe Sensitivität für kleine Lyseraten wichtig.

Bei kleinen Füllungszuständen liegen viele Löcher in der Wand des Thrombuskorbes frei, so dass die anströmende Blutersatzflüssigkeit über viele Kanäle abfließen kann. Die Flussgeschwindigkeiten am Thrombuskorb bleiben damit weitgehend laminar, weshalb sich auch in diesem Bereich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen dem Strömungswiderstand R und dem Füllungszustand L ergibt. Mit zunehmender Korbfüllung stehen der Blutersatzflüssigkeit immer weniger Abflussrinnen zur Verfügung. Der Strömungsquerschnitt wird kleiner, was zu einem deutlichen Anstieg der Flussgeschwindigkeit und damit zu einer Zunahme turbulenter Strömungen im Bereich des Korbes führen muss. Das Verhältnis zwischen R und L wird nun nichtlinear. Der hydrodynamische Widerstand des Korbes steigt bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit mit zunehmender Korbfüllung exponentiell an.

Umgekehrt kommt es bei unverändertem Füllungszustand zur Ausbildung turbulenter Strömungen, wenn die Pumpe zunehmend höhere Flussgeschwindigkeiten erzeugt. Hier folgt der hydrodynamische Widerstand des Korbes einer Potenzfunktion.

Das Auftreten turbulenter Strömungen spiegelt die physiologischen bzw. pathologischen Verhältnisse in Gefäßen wider, deren Durchmesser im Vergleich zur herrschenden Flussgeschwindigkeit zu klein ist. Der zunehmende Verschluss eines Gefäßes wird also sinnvoll modelliert. Allerdings erfordert die Auswertung der erhobenen nichtlinearen Daten einen gewissen mathematischen Aufwand (siehe dazu Abschn. 4.6).

In jedem Fall wird eine Verkleinerung des Thrombus zu der gewünschten Änderung des hydrodynamischen Widerstandes und damit zu einer Abnahme der gemessenen Druckdifferenz führen. Die wesentliche Forderung aus Abschnitt 3.3 nach einem Korb, der eine streng monotone Beziehung zwischen der Thrombusgröße (bzw.- länge) und der zu messenden Druckdifferenz herstellt, ist also erfüllt.

Allerdings weisen die Messpunkte der Abbildung 4.8 auch auf ein eklatantes Problem des Modells hin: Kommt es durch hohe Flussgeschwindigkeiten, einen hohen Füllungszustand des Korbes oder einen großen Abschlusswiderstand bzw. durch eine Kombination aus diesen drei Komponenten zu einer starken Druckbelastungen des Thrombuskorbes, beginnt sich die Blutersatzlösung zwischen Korb und Schlauch auch außerhalb der

dafür vorgesehenen Bypasskanäle (vgl. Abb. 3.6) hindurchzupressen. Der Hüllschlauch wird vom Korb abgehoben, woraus ein unkontrolliertes Vorbeiströmen der Flüssigkeit am Thrombuskorb resultiert. Als Zeichen dafür fällt der Widerstand des Korbes ab. Dieses Verhalten lässt sich in der linken Grafik der Abbildung 4.8 anhand der mit einem roten Kreis markierten Messpunkte nachvollziehen. Dieser Fehler kann bei hohen Füllungszuständen und hohen Flussgeschwindigkeiten zu einer Überschätzung des Lyseeffekts führen. Lösungsansätze für dieses Problem werden in Kapitel 6 vorgestellt. Abschließend sollen noch die empirisch ermittelten Gleichungen der Kennlinien des Thrombuskorbes angegeben werden. Die nichtlinearen Beziehungen zwischen dem Widerstand des Thrombuskorbes R einerseits und der Flussgeschwindigkeit der Blutersatzflüssigkeit V und dem Füllungszustand des Korbes L andererseits lauten:

$$R(V) = a V^\alpha \quad \text{mit} \quad a = a(L) \quad \text{und} \quad \alpha = \alpha(L) \quad , \quad (4.1)$$

$$R(L) = b e^{\beta L} \quad \text{mit} \quad b = b(V) \quad \text{und} \quad \beta = \beta(V) \quad . \quad (4.2)$$

Flussgeschwindigkeit V und Füllungszustand L sind - bis auf einen vernachlässigbaren Fehler (vgl. S. 47) - voneinander unabhängige Systemparameter. Korbwiderstand R und gemessene Druckdifferenz ΔP lassen sich also mathematisch wie folgt ausdrücken:

$$R(V, L) = c V^{\alpha(L)} e^{\beta(V)L} \quad , \quad (4.3)$$

$$\Delta P(V, L) = R(V, L) \cdot A \cdot V = c^* V^{\alpha(L)+1} e^{\beta(V)L} \quad . \quad (4.4)$$

A ist dabei die durchströmte Querschnittsfläche des Laufzeitdifferenzmessers, mit dem die Flussgeschwindigkeit V der Blutersatzlösung gemessen wird. In dem Modell nimmt α Werte zwischen 0 und 1 an. Je kleiner der Wert, desto laminarer ist die Strömung im Bereich des Thrombuskorbes. Für rein turbulente Strömungen würde α den Wert 1 annehmen [31]. Wie genau die hydrodynamischen Verhältnisse am Thrombuskorb durch die empirisch ermittelten Beziehungen beschrieben werden, zeigt sich, wenn man in die Gleichung 4.3 probeweise Werte verschiedener Messungen unter Zuhilfenahme von Abb. 4.8 einsetzt und daraus die Konstante c bestimmt: Für $V = 0.66$ m/s und $L = 100$ % ergibt sich für c ein Wert von 0.7. Für $V = 0.4$ m/s und $L = 73.3$ % erhält man den Wert 0.73. Das entspricht einem Fehler von nur 4 %.

4.4. Generierung physiologischer Flussverhältnisse

Wie bereits in Abschnitt 3.3 erwähnt, sollte das Modell bei eingesetztem Thrombuskorb in der Lage sein, physiologische Flussgeschwindigkeits- und Druckpulskurven zu erzeugen, die der hämodynamischen Situation im Bereich der distalen A. carotis interna (ACI), dem sogenannten C1-Segment, entsprechen.

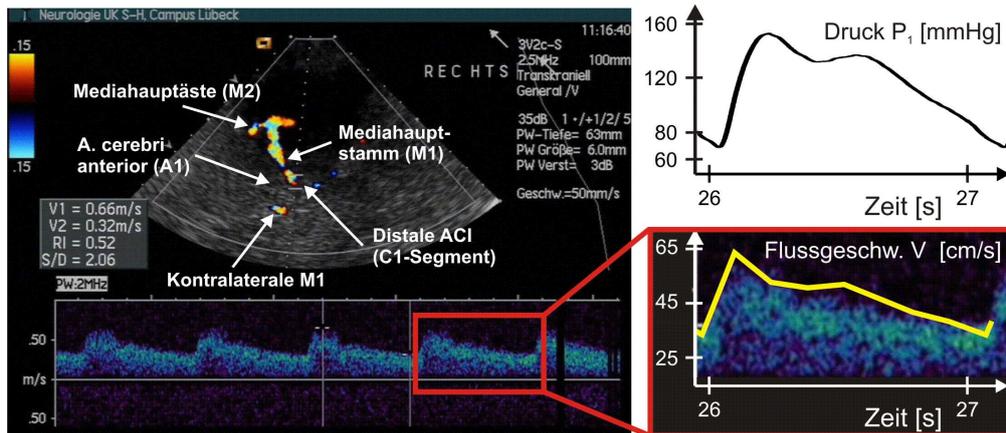


Abb. 4.9.: Vergleich zwischen *in vivo* gemessener und modellierter Flussgeschwindigkeitskurve. Links ist die farbduplexsonographische Darstellung der A. cerebri media eines gesunden Probanden zusammen mit der Flussgeschwindigkeitskurve im Bereich des C1-Segments der A. carotis interna (ACI) zu sehen. Es besteht eine gute Übereinstimmung mit der modellierten Flussgeschwindigkeitskurve (gelb dargestellt). Rechts oben ist die dazugehörige Druckpulskurve des Modells zu sehen. Die generierten Kurven sind Ausschnitte aus Abbildung 3.4.

In Abbildung 4.9 sind eine modellierte und eine mittels farbkodierter transkranieller Duplexsonographie gemessene Flussgeschwindigkeitskurve des C1-Segments der ACI zu sehen. Es lässt sich eine gute Übereinstimmung erkennen. Auch die modellierten Druckverhältnisse entsprechen denjenigen innerhalb der distalen A. carotis interna, wobei im vorliegenden Fall mit dem Nadelventil hypertone Werte eingestellt wurden. Diese hydrodynamischen Randbedingungen dürfen sich im Verlauf eines Versuchs nicht ändern. Bis auf die Applikation von Plasma und Thrombolytikum finden während eines Experiments keine Manipulationen am Versuchsaufbau statt. Plasma und Thrombolytikum werden über dünne Schläuche mit Hilfe von Perfusoren in den Thrombuskorb hineingespritzt (vgl. S. 28). Um die Auswirkung einer solchen Injektion auf die für das Experiment entscheidende Druckdifferenz zu erfassen, wurde diese im Verlauf einer dreistündigen Messung kontinuierlich aufgezeichnet. Die Form der verwendeten Flusspulskurve entsprach dabei derjenigen aus Abbildung 3.4. Nach einer Stunde wurde mit

der Applikation von Ringerlösung bei einer Perfusionsrate von 86 ml/h begonnen. Die Zufuhr der Ringerlösung erfolgte eine Stunde lang. Um andere Einflüsse auf die gemessene Druckdifferenz ausschließen zu können, wurden zur Füllung des Thrombuskorbes inkompressible und unauflöslche Zylinder aus POM verwendet (vgl. S. 28).

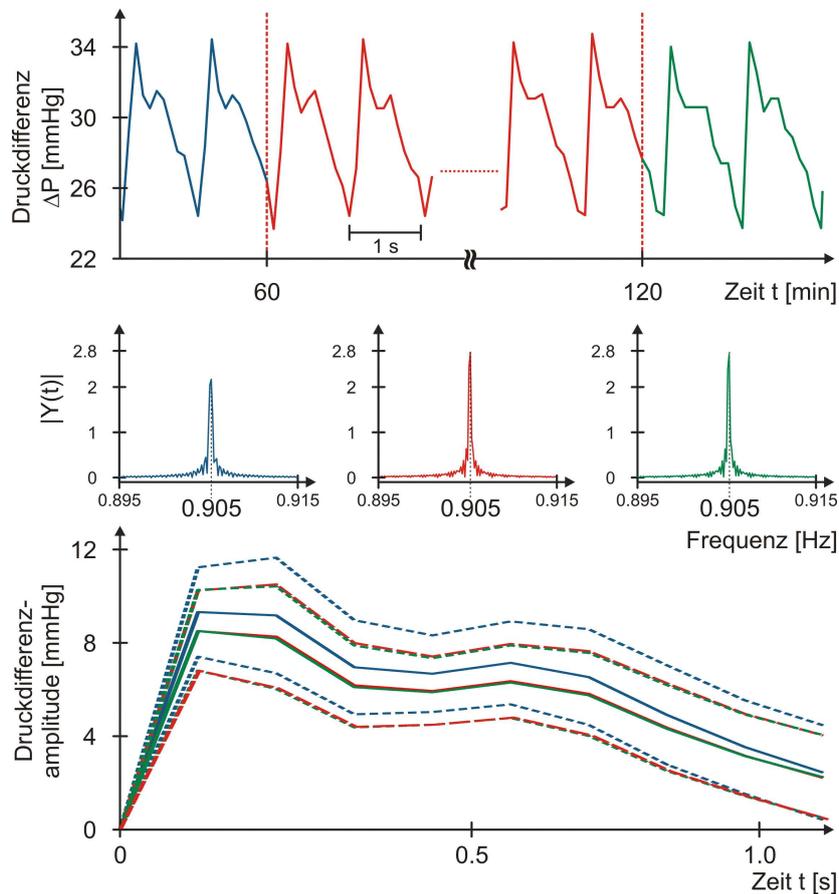


Abb. 4.10.: Analyse der Druckdifferenz in Bezug auf deren Beeinflussung durch Flüssigkeitsinjektionen in das System. Zur besseren Übersicht wurden den drei Abschnitten des Versuchs Farben zugeordnet. Blau steht für den Zeitraum vor Inbetriebnahme des Perfusors, Rot für die Zeitspanne der Perfusion und Grün für die Zeit nach Abschalten des Perfusors. Oben sind die Absolutwerte der aufgezeichneten Druckdifferenz kurz vor und nach dem An- bzw. Abschalten des Perfusors zu sehen. In der Mitte sind die Frequenzspektren der Druckdifferenzkurven aus den drei Abschnitten des Versuchs dargestellt. Unten sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der offset-bereinigten Druckdifferenzpulse über die Zeitdauer eines Druckpulses aufgetragen.

Entsprechend der durchgeführten Ringerinjektion wurde die aufgezeichnete Druckdifferenzkurve in drei Abschnitte unterteilt: Im ersten Abschnitt (von 0 bis 60 min) liegt die Druckdifferenz vor Einschalten des Perfusors, im zweiten (60 - 120 min) die Druckdifferenz bei laufendem Perfusor und im dritten Abschnitt (120 - 180 min) die Druckdifferenz nach Beendigung der Injektion vor. Mit Hilfe einer Fouriertransformation

wurde das Frequenzspektrum der Druckdifferenzkurven in den drei Abschnitten ermittelt. Außerdem wurden Mittelwert und Standardabweichung der Pulswellen in den drei Abschnitten bestimmt. Für die sinnvolle Verrechnung der Pulswellen erfolgte eine offset-Bereinigung der einzelnen Wellen. Sowohl für die Frequenzanalyse als auch für die Mittelung der einzelnen Druckdifferenzwellen wurden für den ersten Abschnitt die Daten der ersten 20 Minuten verworfen, um zu vermeiden, dass die Analyse durch systemimmanente Flussgeschwindigkeitsänderungen (vgl. S. 48) verfälscht wird.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 graphisch dargestellt: Eine Änderung der Druckdifferenz tritt nur beim Übergang vom ersten zum zweiten Abschnitt des Versuchs auf. Sowohl im Zeit- als auch im Frequenzraum sind diese Veränderungen jedoch minimal. Entsprechend der im Modell eingestellten Wiederholungsfrequenz der Flusspulscurven liegt das Maximum der ermittelten Frequenzspektren in allen drei Versuchsabschnitten bei rund 0.9 Hz (übertragen auf das physiologische Äquivalent des Versuchsaufbaus entspricht dies einer Herzfrequenz von 54/min). Auch die Breite der Frequenzspektren verändert sich nicht. Lediglich die Amplitude der Grundfrequenz ist vor Beginn der Perfusion etwas geringer als in den beiden folgenden Abschnitten. Die Höhe der Druckdifferenz ist vor Inbetriebnahme des Perfusors im Mittel um 0.9 mmHg größer, als in den Abschnitten 2 und 3. Ob diese geringfügigen Veränderungen tatsächlich auf die Einwirkung des Perfusors oder auf die bereits in Abschnitt 4.1 besprochene Drift der Flussgeschwindigkeiten zurückzuführen sind, kann nicht mit abschließender Sicherheit entschieden werden. Allerdings legt der Umstand, dass Änderungen nur bei einem der beiden Versuchsübergänge zu verzeichnen waren, den Verdacht nahe, dass als Verursacher eher die Flussgeschwindigkeitsdrift in Frage kommt. Unwahrscheinlich ist dagegen, dass lediglich das Anschalten, nicht aber das Abschalten des Perfusors eine messbare Auswirkung auf das System haben soll. Gegen eine Beeinflussbarkeit des Systems durch eine Injektion von Flüssigkeiten spricht schließlich auch die Konstruktion des Schlauchsystems: Überschüssige Flüssigkeitsvolumina können nämlich mit Hilfe des Überlaufs am eingebauten Reservoir direkt das Schlauchsystem verlassen, so dass ein artifizieller Druckanstieg vermieden wird (Abschn. 3.6.3). Umgekehrt müssen Flüssigkeitsverluste, die beispielsweise durch Verdunstung zustande kommen können, im Verlauf eines Versuchs ausgeglichen werden, um einem Druckabfall entgegenzuwirken.

4.5. Messungen zur Ultraschalltransmission

Untersuchungen zur Sonothrombolyse haben an dem vorgestellten Modell natürlich nur dann einen Sinn, wenn eine ausreichende Ultraschallintensität den Thrombus innerhalb seines Korbes erreicht. Um die klinische Beschallung eines Thrombus im M1-Segment der A. cerebri media eines Patienten simulieren zu können, sollte deshalb die Dämpfung des eingestrahlten Ultraschalls in der richtigen Größenordnung liegen.

Um dies zu überprüfen, wurde anstelle des Thrombus ein Hydrophon (hergestellt vom Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, St. Ingbert, Deutschland) mit einer Mittenfrequenz von 2 MHz und einer Bandbreite von 100 % (1 MHz - 3 MHz) in den Hohlraum des Thrombuskorbes eingeführt. Der Thrombuskorb selbst befand sich entsprechend dem in Abbildung 3.1 vorgestellten Versuchsaufbau innerhalb eines Schlauchstücks, das in einem Becken mit entgastem Wasser platziert wurde. Die auf den Thrombuskorb applizierten Ultraschallwellen wurden von einem SONOS 2500 (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) erzeugt. Als Betriebsmodus wurde die transkranielle, farbkodierte Duplexsonographie mit einer Sendefrequenz von 2MHz und einer Schalleistungsdichte von 179 mW/cm^2 gewählt (vgl. Abschn. 3.8). Dies entspricht einer Einstellung, die üblicherweise bei der klinischen Diagnostik intrakranieller Gefäße eingesetzt wird. Der Abstand zwischen Ultraschallwandler und Hydrophon betrug 50 Millimeter. Dieser Abstand stimmt mit der Eindringtiefe des Ultraschalls bei der Darstellung des M1-Segments der A. cerebri media überein. Unter diesen Bedingungen wurde innerhalb des Thrombuskorbes die Ultraschallintensität I_1 mit dem Hydrophon gemessen und mit Hilfe eines Oszilloskops (HP 54520A, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA) angezeigt. Zur Bestimmung des Referenzwertes I_0 wurde der Ultraschall auf das frei im Wasserbad befindliche Hydrophon gerichtet. Der Abstand betrug auch hier 50 Millimeter. Beide Werte wurden fünfmal gemessen und die Dämpfung A nach der folgenden Vorschrift berechnet:

$$A = 10 \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) . \quad (4.5)$$

Es ergab sich ein Wert von $7.3 \pm 0.7 \text{ dB}$, was bezogen auf die Größenordnung sehr gut mit Literaturwerten übereinstimmt: Laut Aaslid liegt die Dämpfung von 2MHz-

Ultraschallwellen bei ihrem Durchtritt durch den menschlichen Schädel bei 7.0 dB [1]. Pfaffenberger et al. bestimmten die Dämpfung von diagnostischen Ultraschallwellen mit einer Sendefrequenz von 1.8 MHz (Sonos 4500, Philips, Hamburg, Deutschland) für unterschiedlich dicke Schädelkalotten und fanden dabei Werte von 8.8 bis 21.2 dB [49]. An dieser Stelle muss allerdings betont werden, dass Versuche, die mit unterschiedlichen Ultraschallwandlern durchgeführt wurden, nicht direkt miteinander verglichen werden können. Insofern kann aus den vorliegenden Literaturwerten nur geschlossen werden, dass die Dämpfung des Ultraschalls in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau in einem plausiblen und physiologischen Bereich liegt.

4.6. Erfassung und Nachverarbeitung der Druckwerte

In diesem Abschnitt wird die Vorgehensweise zur Erfassung und Nachverarbeitung der im Modell generierten Druckwerte erläutert und kritisch bewertet. Die einzelnen Schritte der Datennachverarbeitung lassen sich anhand eines Beispieldatensatzes in der Abbildung 4.12 nachvollziehen.

4.6.1. Samplingrate und Mittelung der Daten

Vor dem Beginn jeder Versuchsreihe steht immer die Entscheidung, mit welcher Abtastrate das zu erfassende Signal aufgezeichnet werden soll. Eine zu hohe Abtastrate produziert redundante Daten, die aufgrund ihres Umfangs schnell zu Speicherproblemen führen können. Wählt man eine zu niedrige Samplingrate, läuft man Gefahr, wesentliche Signalinformationen zu verlieren und unbrauchbare Ergebnisse zu erhalten. Für die Aufzeichnung der vor und hinter dem Thrombuskorb anliegenden Druckwerte wurde eine Abtastrate von 10 Hz festgelegt. Da die Grundfrequenz des Signals im Bereich von 1 Hz (bzw. die simulierte Herzfrequenz bei rund 60 Schlägen / Minute) liegen soll und zur Form der Druckpulsquelle lediglich die ersten fünf harmonischen Oberschwingungen einen wesentlichen Beitrag liefern, ist diese Abtastrate nach dem Nyquist-Theorem gerade noch hoch genug.

Um dies zu überprüfen, wurden die Druckpulsquellen einmal mit 10 und ein weiteres Mal mit 100 Hz im Verlauf eines dreiminütigen Versuchs aufgezeichnet. Die Einstel-

lungen an der Pumpe waren die gleichen, die zur Ausbildung der in Abbildung 3.4 zu sehenden Flusspulskurve führten. Der Thrombuskorb war mit POM-Zylindern gefüllt. Verglichen wurden die berechneten Druckdifferenzkurven und deren Frequenzspektr. In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der Untersuchung grafisch aufgetragen.

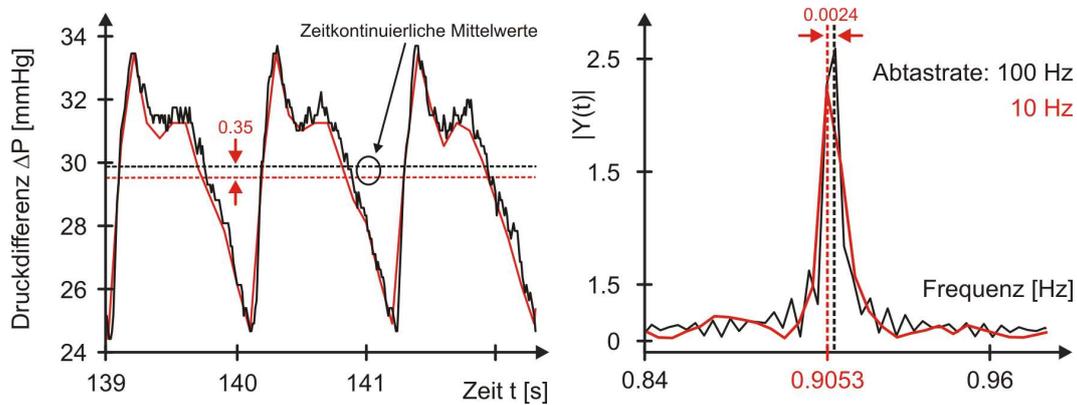


Abb. 4.11.: Auswirkung unterschiedlicher Samplingraten auf die gemessene Druckdifferenz und deren Frequenzspektrum. Links sind die Druckdifferenzen und deren zeitkontinuierliche Mittelwerte, rechts die durch eine Fourieranalyse gewonnenen Frequenzspektr. der mit 10 bzw. mit 100 Hz abgetasteten Druckpulswellen aufgetragen.

Erwartungsgemäß hat die Wahl der Samplingrate einen nachweisbaren Effekt auf die erhobenen Daten. Die für unsere Experimente entscheidende Druckdifferenz verändert sich hinsichtlich Form und Betrag. Sowohl im Zeit- als auch im Frequenzraum sind die so entstandenen Unterschiede allerdings sehr gering, so dass die Verwendung der niedrigen Abtastrate von 10 Hz durchaus zu rechtfertigen ist.

Der Mittelwert der Druckdifferenz der mit 10 Hz aufgezeichneten Druckpulskurven ist um 0.35 mmHg kleiner im Vergleich zur 100-Hz-Messung. Bezogen auf die absolute Druckdifferenz von 29.9 mmHg bei 100 Hz Abtastrate entspricht dies einem relativen Fehler von nur 1.2 %. Für die Frequenzverschiebung ist der relative Fehler mit 0.26 % noch einmal deutlich kleiner. Trotz dieser geringen Fehler ist darauf zu achten, dass nur Ergebnisse von Versuchen miteinander verglichen werden dürfen, die mit der gleichen Abtastrate aufgezeichnet wurden.

Zur Beurteilung des Lyseprozesses ist eine zeitliche Auflösung im Sekundenbereich mehr als ausreichend. Deshalb wird für die Auswertung der geplanten Versuche nur der zeitkontinuierlich über wenige aufeinanderfolgende Druckdifferenzwellen berechnete Mittelwert verwendet (vgl. Abb. 4.11). Durch diese zeitkontinuierliche Mittelung spielen Formveränderungen der Druckdifferenzwelle, die durch eine niedrige Abtastra-

te hervorgerufen werden, für das spätere Ergebnis keine Rolle mehr.

Den vertretbaren Ungenauigkeiten steht der enorme Vorteil einer durch die reduzierte Samplingrate um den Faktor 10 drastisch verkleinerten Datenmenge gegenüber. Der erforderliche Speicherplatz für eine Messung des in Kapitel 5 vorgestellten Versuchs beträgt so nur noch 1.4 MB anstelle von 14 MB bei einer Abtastrate von 100 Hz.

4.6.2. Driftbereinigung

Wie bereits auf Seite 48 diskutiert wurde, muss im Verlauf jedes Versuchs mit einer kleinen systemimmanenten Drift gerechnet werden, die vermutlich durch eine Schwankung der Pumpendrehzahl, eine Erwärmung und Aufdehnung des Schlauchsystems oder die Trägheit der bewegten Flüssigkeit innerhalb des Schlauchsystems zu erklären ist. Um störende Einflüsse dieser Drift auf die erhobenen Versuchsdaten weitgehend zu eliminieren, werden unter Beibehaltung der eingestellten hydrodynamischen Versuchsbedingungen Kontrollmessungen durchgeführt, bei denen der Thrombus durch inkompressibles Polyoxymethylen (POM) ersetzt wird. Die dabei nachgewiesenen, vom Thrombus unabhängigen Änderungen der Druckdifferenz werden dann von den Druckdifferenzdaten des eigentlichen Versuchs abgezogen. Dieser Schritt der Datennachverarbeitung wird in der vorliegenden Arbeit „Driftbereinigung“ genannt.

Sei also $\Delta P_i^*(t)$ die durch eine Drift überlagerte Druckdifferenz, die während eines Thrombusversuchs i über dem Korb gemessen wird, und $\Delta P_{POM,j}(t)$ eine der anschließend durchgeführten Kontrollmessungen, dann ergibt sich bei j durchgeführten Kontrollmessungen für die Drift

$$D(t) = \overline{\Delta P}_{POM}(t) - \overline{\Delta P}_{POM}(0) \quad \text{mit} \quad \overline{\Delta P}_{POM}(t) = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \Delta P_{POM,j}(t) \quad , \quad (4.6)$$

und für die driftbereinigte Druckdifferenz

$$\Delta P_i(t) = \Delta P_i^*(t) - D(t) \quad . \quad (4.7)$$

4.6.3. Normierung

Ziel der hier vorgestellten Methode ist die Bestimmung der Thrombolyse über die kontinuierliche Messung der Druckdifferenz $\Delta P(t)$, die über dem Thrombuskorb anliegt und im wesentlichen durch den Füllungszustand L des Korbes, also durch das Volumen des zu untersuchenden Thrombus, bestimmt wird. In Abschnitt 4.3 zeigte sich jedoch, dass aufgrund nichtlinearer Strömungen diese Druckdifferenz auch von der Flussgeschwindigkeit V der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit abhängig ist (Gl. 4.4). Aufgrund dieser Wechselwirkungen müssen zwei wesentliche Punkte bei der weiteren Datenanalyse berücksichtigt werden:

1. Auch bei unveränderten hydrodynamischen Rahmenbedingungen wird es zu kleinen Abweichungen zwischen den Startwerten der gemessenen Druckdifferenz kommen, da der Thrombuskorb zum einen nie exakt gleich beladen, bzw. das Thrombusvolumen (der Füllungszustand L) nie identisch sein wird, und zum anderen die Zusammensetzung der Thromben trotz des standardisierten Gerinnungsprotokolls Schwankungen unterliegt. Die Lyseraten der Thromben können also aufgrund der unterschiedlichen Startwerte der Druckdifferenz bzw. aufgrund des variierenden Füllungszustandes L nicht direkt miteinander verglichen werden.
2. Problematisch ist auch der eventuell gewünschte Vergleich zwischen Versuchen, die bei unterschiedlichen Strömungsverhältnissen durchgeführt wurden, um beispielsweise den Einfluss kreislaufrelevanter Parameter, wie Blutdruck und Herzfrequenz, auf die Thrombolyse zu untersuchen. Der nichtlineare Zusammenhang zwischen der gemessenen Größe $\Delta P(t)$ und der eingestellten Flussgeschwindigkeit V verbietet einen direkten Vergleich solcher Messungen.

Das zweite Problem ließe sich natürlich mit der Vorschrift umgehen, dass nur Versuche mit denselben Flussbedingungen zu vergleichen sind. Die analytischen Möglichkeiten des Modells wären dadurch jedoch drastisch eingeschränkt. Die zuerst genannte Schwierigkeit kann dagegen versuchstechnisch nicht weiter aufgelöst werden.

Einen Ausweg bietet die Normierung des Startwertes der Druckdifferenzen auf den Wert 1, also die Division der während eines Versuchs i aufgezeichneten und anschließend driftbereinigten Zeitreihe $\Delta P_i(t)$ (Gl. 4.7) durch ihren jeweiligen Startwert $\Delta P_i(0)$.

Man erhält so eine dimensionslose Größe, die sogenannte „normierte Druckdifferenz“ $Z_i(t)$, die sich unter Verwendung von Gleichung 4.4 wie folgt ausdrücken lässt ²:

$$Z_i(t) = \frac{\Delta P_i(t)}{\Delta P_i(0)} = \frac{V^{\alpha(L)+1} e^{\beta(V)L(t)}}{V^{\alpha(L_0)+1} e^{\beta(V)L_0}} = V^{\alpha(L)-\alpha(L_0)} e^{\beta(V)(L(t)-L_0)} \quad . \quad (4.8)$$

L_0 ist dabei der Füllungszustand des Korbes zum Startzeitpunkt der Messung und entspricht somit dem initialen Thrombusvolumen. $L(t)$ ist der sich im Verlauf des Versuchs ändernde Füllungszustand des Korbes.

Zum Zeitpunkt $t=0$ ist $\alpha(L) = \alpha(L_0)$ und $L(t) = L_0$, wodurch sich zwingend für alle Thromben selbst bei einem unterschiedlichen Ausgangsvolumen der Startwert $Z(0) = 1$ und im weiteren Verlauf eine Relativierung der gemessenen Druckdifferenzen auf den individuellen Ausgangswert $\Delta P(0)$ bzw. das individuelle Startvolumen des Thrombus ergibt. Thromben unterschiedlicher Größe lassen sich also ohne weiteres mit Hilfe der normierten Druckdifferenz vergleichen. Damit wäre das erste Problem gelöst.

Um auch noch Versuche mit unterschiedlichen Strömungsverhältnissen vergleichen zu können, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt werden: Erstens darf sich der Exponent α trotz seiner Abhängigkeit vom Füllungszustand L (Gl. 4.1) im Verlauf eines Lyse-experiments nicht zu stark ändern. Zweitens muss die Abhängigkeit zwischen β und der Flussgeschwindigkeit V (Gl. 4.2) zu vernachlässigen sein. Unter diesen Bedingungen ergibt sich für den Term $V^{\alpha(L)-\alpha(L_0)}$ der Wert 1 und $\beta(V)$ wird zu einer einfachen Konstanten β . Die normierte Druckdifferenz $Z(t)$ hängt dann nur noch vom Füllungszustand des Korbes bzw. vom Thrombusvolumen und somit nur noch von der Lyserate, aber nicht mehr von der Flussgeschwindigkeit V ab:

$$Z(t) = e^{\beta(L(t)-L(0))} \quad . \quad (4.9)$$

Unter diesen Voraussetzungen lassen sich mit Hilfe der normierten Druckdifferenz selbst Versuche mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten vergleichen.

Mit einer kurzen Berechnung sollen nun die Fehler, die sich unter Annahme der eben

²Die Werte der Kennlinien wurden durch relativ kurze Versuche von dreiminütiger Länge bestimmt, so dass sich hier die Drift kaum auf die erhobenen Daten auswirken konnte (vgl. Abb. 4.3). Die aus den Kennlinien abgeleitete Beziehung für $\Delta P(V, L)$ (Gl. 4.4) ist also die von der Drift noch unbeeinträchtigte Druckdifferenz. Im Verlauf einer vierstündigen Versuchsmessung kommt es dann aber zu einer Überlagerung dieser Beziehung durch die Drift, die dann mittels Driftbereinigung näherungsweise wieder herausgerechnet wird.

erwähnten Voraussetzungen bei einem Vergleich von Versuchen unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten ergeben, bestimmt werden: Angenommen, es werden die normierten Druckdifferenzen Z_1 und Z_2 zweier Versuche mit den Flussgeschwindigkeiten V_1 und V_2 verglichen, bei denen sich die Thromben gleich verhalten, bzw. sich in gleicher Weise aufgelöst haben. Vom Füllungszustand (Thrombusvolumen) L_A ausgehend erreichen beide Thromben den Füllungszustand L_B . Die beiden normierten Druckdifferenzen sollte dann idealerweise gleich groß sein:

$$\frac{Z_1}{Z_2} = \left(\frac{V_1}{V_2}\right)^{\alpha(L_A)-\alpha(L_B)} e^{(L_A-L_B)[\beta(V_1)-\beta(V_2)]} = 1 \quad . \quad (4.10)$$

Da aber $V_1 \neq V_2$ ist, entsteht der Fehler $\varepsilon = \varepsilon_1 + \varepsilon_2$, wobei sich die beiden Einzelfehler nach Gleichung 4.10 wie folgt berechnen lassen:

$$\varepsilon_1 = \left(\frac{V_1}{V_2}\right)^{\alpha(L_A)-\alpha(L_B)} - 1 \quad , \quad (4.11)$$

$$\varepsilon_2 = e^{(L_A-L_B)[\beta(V_1)-\beta(V_2)]} - 1 \quad . \quad (4.12)$$

Vergleicht man also beispielsweise zwei Experimente, in denen die Flussgeschwindigkeiten $V_1 = 66$ cm/s und $V_2 = 20$ cm/s eingestellt waren ³ und sich ausgehend von einem jeweils voll gefüllten Thrombuskorb eine Lyserate von 27 % einstellte (d.h. $L_A = 100\%$ und $L_B = 73\%$), liegen die Fehler bei $\varepsilon_1 = 2.9\%$ und $\varepsilon_2 = 0.16\%$, womit sich ein Gesamtfehler von lediglich 3.06 % ergibt. Die α - und β -Werte müssen dabei aus den Kennlinien des Thrombuskorbes (Abb. 4.8) abgelesen werden ⁴. Die Berechnungen belegen eine relativ starke L -Abhängigkeit des Parameters α und eine schwache V -Abhängigkeit des Parameters β . Wie soeben gezeigt, führt die verhältnismäßig starke L -Abhängigkeit von α bei kleinen Lyseraten trotzdem nur zu kleinen Fehlern.

Zusammenfassend lässt sich aus den angestellten Berechnungen folgern, dass die normalisierte Druckdifferenz auch bei erheblichen Flussgeschwindigkeitsunterschieden zum Vergleich von Lyseexperimenten herangezogen werden kann, sofern die auftretenden Lyseraten unter 27 % liegen. Der Fehler wird dabei immer kleiner als 3 % sein.

Für den Einsatz der normierten Druckdifferenz ist es wichtig, die soeben diskutierten

³Größere oder kleinere Flussgeschwindigkeiten kamen im Rahmen dieser Arbeit nicht vor.

⁴Man findet: $\alpha(L_A) = 0.356$, $\alpha(L_B) = 0.332$, $\beta(V_1) = 0.027$ und $\beta(V_2) = 0.021$.

Vorteile und Grenzen des zugrundeliegenden mathematischen Verfahrens zu kennen. Damit auch die Interpretation der abschließend erzeugten Daten keine Schwierigkeiten bereitet, sollen an dieser Stelle noch ein paar Anmerkungen gemacht werden.

Der Kurvenverlauf der normierten Druckdifferenz $Z(t)$ beginnt für jeden Versuch bei dem Wert 1. Werte größer 1 weisen auf eine Zunahme des hydrodynamischen Widerstands hin. Erklärbar wäre ein solcher Effekt durch eine Kompaktierung des eingesetzten Thrombus durch die anströmende Flüssigkeit und somit durch einen dichteren Verschluss des Thrombuskorbes, durch eine tatsächliche Zunahme des Thrombusvolumens infolge einer Flüssigkeitseinlagerung oder aber durch eine Verlegung der Bypasskanäle des Thrombuskorbes (vgl. Abb. 3.6). Der zuletzt genannte Fall sollte durch eine Inspektion der Bypasskanäle ausgeschlossen werden, was aufgrund der transparenten Schläuche auch während eines laufenden Versuchs ohne weiteres möglich ist. Zu erwarten ist allerdings, dass sich der Thrombus im Verlauf eines Lyseexperiments verkleinert. Dann nimmt $Z(t)$ immer weiter ab und läuft mit zunehmender Thrombolyse gegen Null. Der Wert Null wird jedoch selbst bei einer vollständigen Auflösung des Thrombus nicht exakt erreicht, weil auch der leere Thrombuskorb einen messbaren hydrodynamischen Widerstand hat (vgl. S. 53). Größere Ungenauigkeiten resultieren daraus aber nur dann, wenn Versuche mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und subtotalen Lyseraten verglichen werden⁵. Da jedoch, wie bereits ausführlich diskutiert wurde, der Einsatz der normierten Druckdifferenz für einen solchen Fall ohnehin nicht vorgesehen ist, ergibt sich aus diesem Umstand kein Problem.

Die Alternative zur normierten Druckdifferenz wird im folgenden Abschnitt vorgestellt.

4.6.4. Umrechnungskurven

Führt die Verwendung der normierten Druckdifferenz zu Problemen, insbesondere beim Vergleich größerer Lyseraten, die unter dem Einfluss verschiedener Strömungsbedingungen aufgezeichnet wurden, sollte man auf die in Abbildung 4.13 dargestellten Umrechnungskurven zurückgreifen.

⁵Der normierte Druckdifferenzwert $Z(t)$ variiert bei vollständiger Thrombolysen in Abhängigkeit von der eingestellten Flussgeschwindigkeit V , da zu seiner Berechnung durch $\Delta P(0)$ dividiert wird (Gl. 4.8) und dieser Wert abhängig von V ist. So ergeben sich aus den Kennlinien (Abb. 4.8) bei $V_1 = 66$ cm/s und $V_2 = 20$ cm/s im Fall einer kompletten Lyse für $Z(t)$ die Werte 0.08 bzw. 0.13.

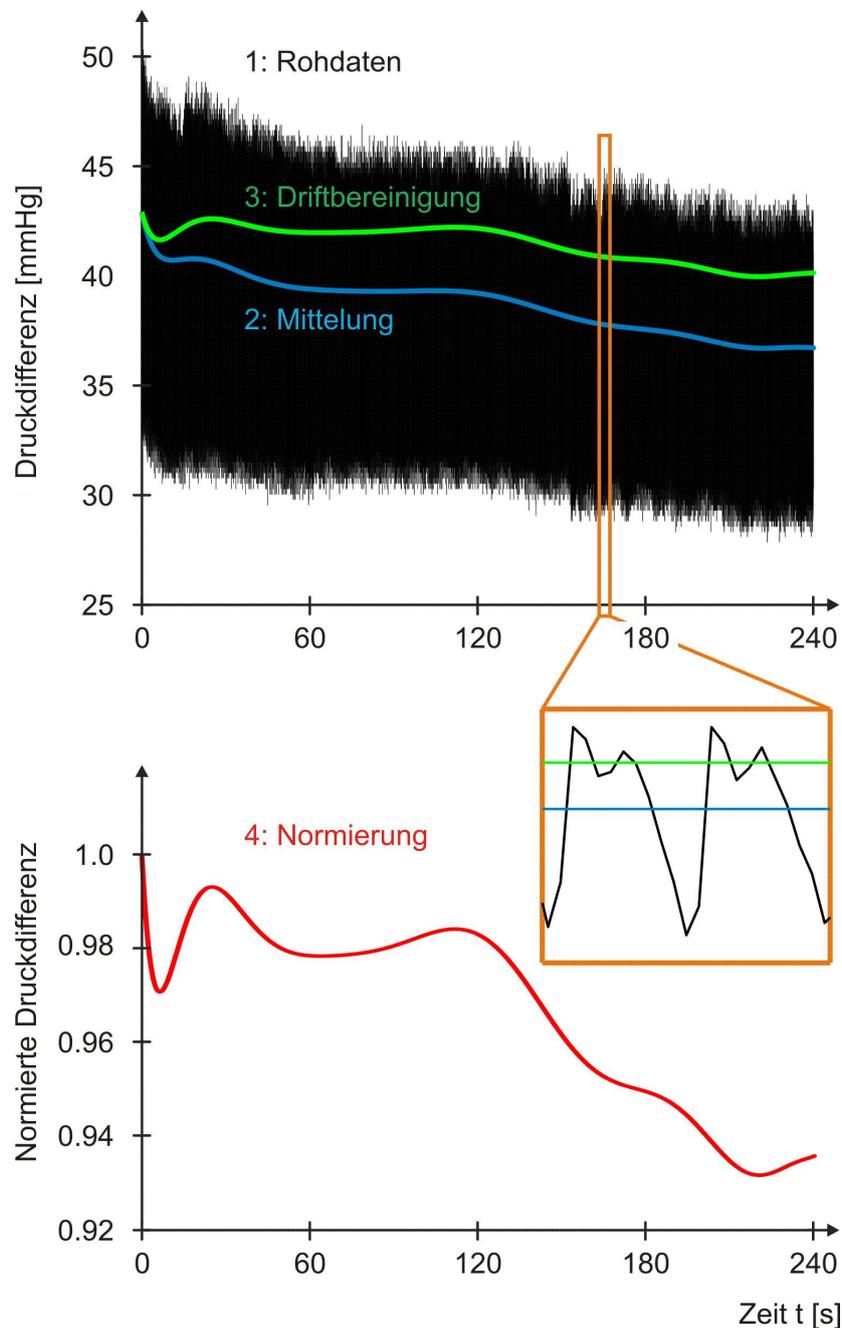


Abb. 4.12.: Die einzelnen Schritte der Datennachverarbeitung. Die pulsatilen Rohdaten eines Versuchs (schwarz) werden zunächst gemittelt. Von den gemittelten Daten (blau) wird die Drift abgezogen, wodurch die grün gezeichnete Kurve entsteht. Abschließend werden die Daten durch den Startwert dividiert. Die so erhaltene Kurve der dimensionslosen normierten Druckdifferenz (rot) beginnt deshalb immer bei dem Wert 1. An dem Beispieldatensatz ist gut zu erkennen, dass die Drift hauptsächlich in den ersten 45 Minuten der Messung auftritt. In diesem Bereich ist die Veränderung der Daten, die durch die Driftbereinigung zustande kommt, am deutlichsten zu sehen.

Die Werte der Umrechnungskurven ergeben sich aus den Daten der rechts in Abbildung 4.8 gezeigten Grafik. Sie basieren also auch auf der wiederholten Durchführung voneinander unabhängiger Messungen.

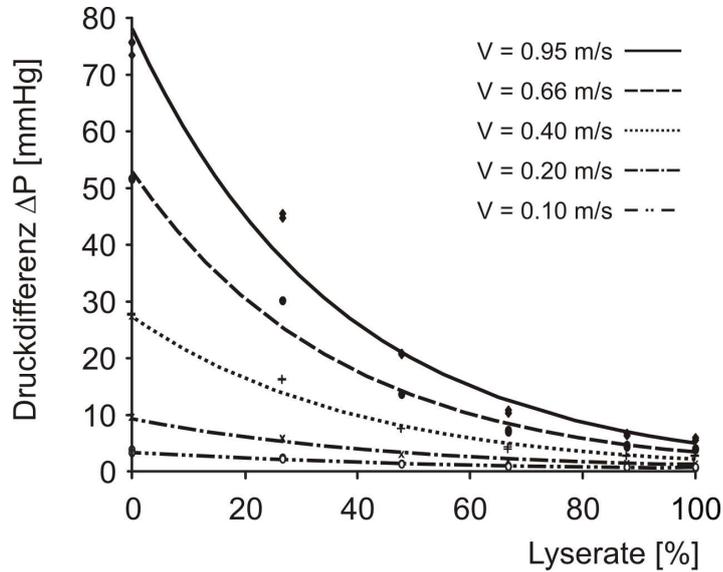


Abb. 4.13.: Umrechnungskurven. Mit Hilfe der Umrechnungskurven kann nach Wahl der zur Flussgeschwindigkeit V eines Versuchs passenden Kurve für jede gemessene Druckdifferenz ΔP die entsprechende Lyserate ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kamen die Umrechnungskurven noch nicht zum Einsatz, da bei den abschließenden Versuchen, die im Kapitel 5 vorgestellt werden, pulsatile Flussgeschwindigkeiten eingesetzt wurden. Die Umrechnung der Druckdifferenz hätte also zunächst nur näherungsweise über die mittlere Flussgeschwindigkeit der pulsatilen Strömung erfolgen können.

Vor Verwendung der Umrechnungskurven sollten außerdem noch mehr Daten erhoben werden, um die Kurven genauer zu bestimmen und deren Anzahl zu erhöhen.

Ansonsten ist die Umrechnung der gemessenen Druckdifferenz $\Delta P(t)$ in die interessierende und besser zu interpretierende Lyserate mit Hilfe der Umrechnungskurven ohne Einschränkungen möglich und ließe sich selbstverständlich auch mit Hilfe eines Algorithmus automatisieren. Da über die gesamte Versuchsdauer sowohl die Flussgeschwindigkeit V als auch die Druckdifferenz $\Delta P(t)$ aufgezeichnet werden, könnte ein solches Programm auch für pulsatile Flüsse eine zeitkontinuierliche Kurve der Lyserate erstellen.

4.7. Validierung des Thrombusmodells

Die Herstellung der Thromben basiert auf der Verwendung von plättchenreichem Plasma (PRP). Durch diesen Ansatz soll die zentrale Rolle der Thrombozyten während des Gerinnungsprozesses und ihre hohe Konzentration am Entstehungsort physiologischer Thromben, nämlich an der Innenwand der Blutgefäße, berücksichtigt werden.

Um das Ausmaß der so erzielten Thrombozytenanreicherung festzustellen, wurde die zelluläre Zusammensetzung des PRP-Gemischs bestimmt (Micros 60 OS/OT[®], HORIBA ABX Diagnostics, BP 7290, 34184 Montpellier Cedex 4, Frankreich) und mit dem Blutbild des initial gesammelten Vollbluts verglichen (Tab. 4.1).

	Venöses Vollblut (n=4)	PRP-Ansatz (n=10)
Leukozyten [/nl]	5.4 (0.3)	4.4 (0.6)
Erythrozyten [$10^{12}/l$]	4.2 (0.09)	0.3 (0.04)
Hämoglobin [g/l]	122.3 (2.1)	8.6 (1.7)
Hämatokrit [%]	36.9 (0.3)	2.5 (0.4)
Thrombozyten [/nl]	224.8 (22.7)	488.8 (42.3)

Tab. 4.1.: Zelluläre Zusammensetzung des venösen Vollbluts und des daraus gewonnenen, zur Thrombusgenerierung eingesetzten PRP-Gemischs. Das venöse Vollblut besteht aus einem Pool von insgesamt 8 Probanden der gleichen Blutgruppe, denen jeweils 8 ml venöses Blut entnommen wurde. Aus diesem Pool wurde das plättchenreiche Plasma (PRP) gewonnen und das PRP-Gemisch zur Thrombusgenerierung erstellt (siehe Gerinnungsprotokoll auf Seite 42). Aufgelistet sind Mittelwerte und in runden Klammern die dazugehörigen Standardabweichungen. Beim Vollblut bezieht sich der n-Wert auf die Anzahl der Messwiederholungen aus dem Blutpool. Beim PRP-Gemisch steht der n-Wert für die Anzahl der separat aus dem Blutpool angefertigten Gemische.

8 Probanden der gleichen Blutgruppe wurden jeweils 8 ml venöses Vollblut entnommen und zu einem Pool vermischt. Das Blutbild dieses Blutpools wurde viermal hintereinander bestimmt, bevor aus dem Vollblutpool unabhängig von einander 10 PRP-Gemische nach dem im Abschnitt 3.10 erläuterten Gerinnungsprotokoll angefertigt wurden. Die PRP-Gemische bestehen aus PRP und der zwischen dem Überstand und der Erythrozytenschicht gelegenen Grenzschicht in einem Verhältnis von 7:1. Das Blutbild der 10 Gemische wurde auf die gleiche Weise wie beim Vollblutpool bestimmt.

Die Werte der Tabelle 4.1 belegen, dass mit dem PRP-Ansatz eine Umverteilung der Zellzahlen erzielt werden konnte. Obgleich die Gerinnung unter statischen Bedingungen durchgeführt wurde, entsteht eine Zellverteilung, wie man sie - zumindest qualitativ - an der Innenseite der Blutgefäße im strömenden Blut erwarten würde. Dort nimmt die Anzahl der einzelnen Blutzellen in den äußeren Schichten des strömenden Bluts mit zunehmender Zellgröße ab. Dementsprechend findet sich in dem PRP-Ansatz eine hohe Thrombozytendichte und eine geringere Leukozyten- und Erythrozytenkonzentration. Da es keine Referenzwerte für die Blutzusammensetzung der einzelnen Schichten des *in vivo* strömenden Bluts gibt, lässt sich dieses Ergebnis quantitativ allerdings nicht weiter überprüfen.

Im Verhältnis zu den bestimmten Mittelwerten liegen die Standardabweichungen beim PRP-Gemisch wesentlich höher als beim venösen Vollblut. Das liegt daran, dass es sich bei der Analyse des Vollbluts statistisch betrachtet um eine reine Messwiederholung, bei der Untersuchung der PRP-Gemische dagegen um die Messung unabhängiger Einzelproben handelt, da jedes PRP-Gemisch nach dem gleichen Gerinnungsprotokoll aber dennoch separat aus dem Vollblutpool hergestellt wurde. Während also die mehrfach durchgeführte (n=4) Messung des Vollbluts lediglich Hinweise auf die Reproduzierbarkeit der Messung im Blutbildanalysator gibt, lassen sich aus den Standardabweichungen der wiederholten (n=10) PRP-Gemischanalysen Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit des Gerinnungsprotokolls ziehen. Diese ist zumindest in Bezug auf die erzielte Thrombozytenzahl zufriedenstellend, wenn man bedenkt, dass die Ungenauigkeiten des Blutbildanalysators in der gleichen Größenordnung liegen. Das Verhältnis von Standardabweichung und Mittelwert beträgt sowohl bei den Messungen des venösen Vollbluts als auch bei den Messungen des PRP-Gemischs für die Thrombozyten rund 10%. Bezüglich der Erythrozyten- und Leukozytenzahlen lassen sich jedoch deutlich größere Schwankungen innerhalb der unterschiedlichen PRP-Ansätze feststellen. Dies kann durch das erschwerte Pipettieren der dünnen Grenzschicht erklärt werden. Für die Gerinnung ergeben sich jedoch aus diesen Ungenauigkeiten keine wesentlichen Konsequenzen. Entscheidend ist hierbei nur die hohe Thrombozytenkonzentration und das mengenmäßige Verhältnis von Thrombozyten und Erythrozyten. Letztere bilden den Hauptanteil der Blutzellen und sind damit in erster Linie für das Volumen des Thrombus verantwortlich.

4.7.1. Untersuchungen zur Stabilität der Thromben

Als ein wichtiges Qualitätsmerkmal der zu verwendenden Thromben wurde in Abschnitt 3.10 deren ausreichende Stabilität in physiologischen Strömungen festgelegt. Zerfallen die Thromben unter der hydrodynamischen Belastung zu schnell, ist es unmöglich, eine enzymatisch oder sonographisch bedingte Thrombolysen von dieser rein mechanisch bedingten Auflösung abzugrenzen. Abgesehen davon soll die Wirkungsweise der Sonothrombolysen an Thromben untersucht werden, die ohne Behandlung zu einem längerfristigen Gefäßverschluss bzw. zu einer neurologischen Symptomatik führen würden und somit über eine entsprechende Festigkeit verfügen müssen.

Zur Untersuchung der mechanischen Stabilität wurden 5 Thromben, die gemäß des auf Seite 42 vorgestellten Gerinnungsprotokolls erzeugt wurden, im Modell den Kräften einer pulsatischen Strömung ausgesetzt. Die dabei eingestellten physiologischen Druck- und Flussgeschwindigkeitskurven lassen sich der Abbildung 3.4 entnehmen. Die PRP-Thromben zeigten nur während der ersten 30 Minuten eine geringfügige Auflösung und verhielten sich über die verbleibende Versuchsdauer von 3,5 Stunden stabil (Abb. 4.14).

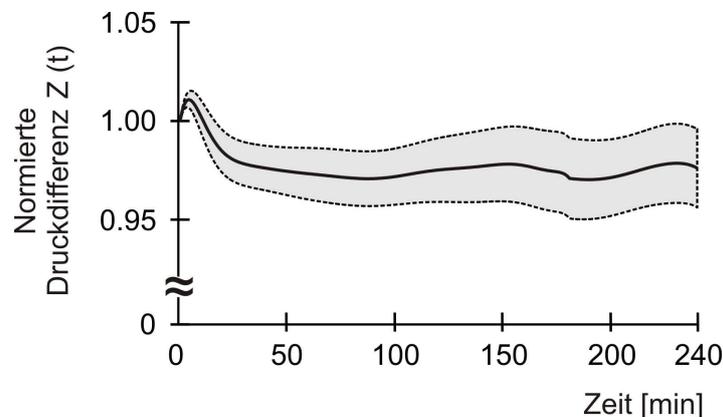


Abb. 4.14.: Zeitlicher Verlauf der normierten Druckdifferenz über dem thrombusgefüllten Korb bei physiologischen Strömungsverhältnissen (n=5). Trotz der pulsatischen Scherkräfte lösen sich die PRP-Thromben im Verlauf der ersten halben Stunde nur geringfügig auf. Danach zeigen sie ein hydrodynamisch stabiles Verhalten. Dargestellt sind Mittelwert (durchgezogene Linie) und Standardfehler (gepunktete Linien).

Im Gegensatz dazu lösten sich Thromben, die entsprechend der bislang am meisten verwendeten Gerinnungsprotokolle aus einer spontanen Gerinnung von Vollblut oder der Rekalzifizierung von Citratblut entstanden waren, binnen weniger Sekunden auf, so dass überhaupt keine Messwerte erhoben werden konnten. Zu einer vorzeitigen Auflö-

sung dieser Thromben kam es selbst bei der Einstellung unphysiologischer, konstanter Flussgeschwindigkeiten mit einer proximalen Druckbelastung von nur 30 mmHg.

4.7.2. Histologische Untersuchung der Thromben

Zur histologischen Beurteilung wurden 10 Thromben nach dem Gerinnungsprotokoll aus Abschnitt 3.10 angefertigt, in 4 %iger Formaldehydlösung 24 Stunden lang fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Schnittfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin und mit der Ladewig-Färbung zur Darstellung des Fibrins. Der immunhistochemische Nachweis der Thrombozyten erfolgte mit Streptavidin-gelabelten Antikörpern gegen CD42 oder CD61 (ZYTOMED Systems GmbH, Berlin, Deutschland).

Zum Vergleich wurden drei weitere Gruppen von Thromben auf dieselbe Weise präpariert: Die erste Gruppe bestand aus 4 Thromben, die bei neuroradiologischen Notfallinterventionen aus der A. basilaris oder der A. cerebri media von Schlaganfallpatienten entfernt wurden, nachdem zuvor eine insuffiziente systemische Thrombolyse durchgeführt worden war. Die beiden anderen Gruppen umfassten jeweils 10 Thromben, die aus den bislang am häufigsten publizierten Gerinnungsprotokollen hervorgegangen waren. Es handelt sich dabei zum einen um die spontane Gerinnung von venösem Vollblut und zum anderen um die Gerinnung von rekalkifiziertem Citratblut. In beiden Fällen fand die Gerinnung bei 37°C über eine Inkubationsdauer von 2 Stunden statt.

Die Bewertung der insgesamt 34 Thromben erfolgte durch Herrn Dr. Stellmacher, einem erfahrenen und hinsichtlich der Thrombusentstehung verblindeten Pathologen des Forschungszentrums Borstel. Es wurde ein Mikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 21079 Hamburg, Deutschland) mit Plan Neofluar-Objektiven und einem Hellfeldkondensator verwendet. Abbildung 4.15 zeigt die histologischen Präparate jeweils eines typischen Vertreters der vier unterschiedlich entstandenen Thromben.

Der Pathologe fasste die untersuchten Thromben in drei Gruppen zusammen. Nach Aufhebung der Verblindung stellte sich heraus, dass die Gruppe I alle *in vivo* entstandenen Thromben umfasst, die Gruppe II alle Thromben, die mit Hilfe des PRP-Gerinnungsprotokolls generiert wurden. Der letzten Gruppe III waren alle Thromben zugeordnet worden, die aus spontan geronnenem Vollblut oder rekalkifiziertem Citratblut bestanden, ohne dass eine weitere Differenzierung möglich gewesen wäre.

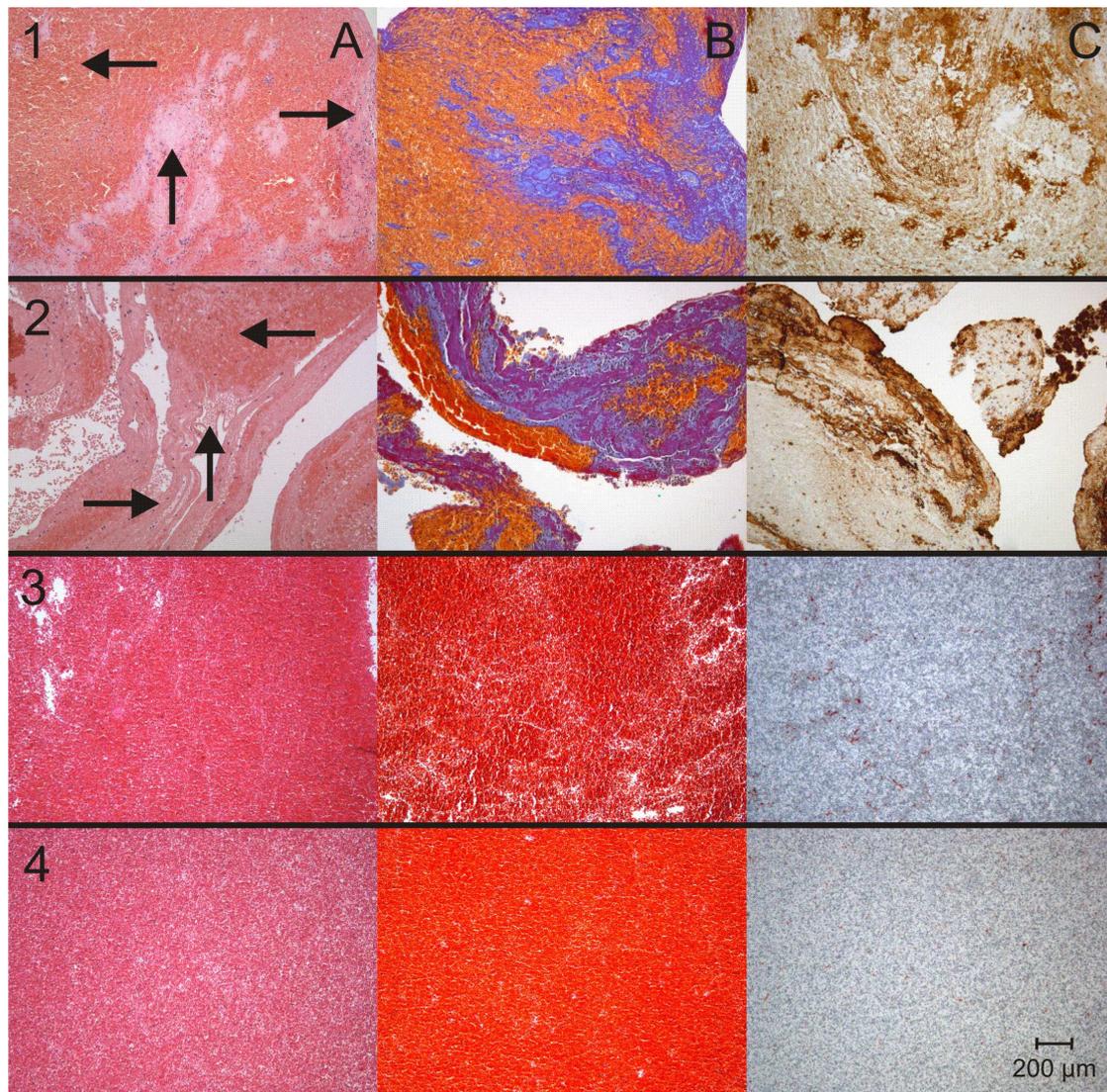


Abb. 4.15.: Histologischer Vergleich unterschiedlich entstandener Thromben. Dargestellt sind jeweils drei histologische Präparate (A - C) von vier unterschiedlichen Thromben (1 - 4). Bei den Thromben handelt es sich um einen *in vivo* entstandenen arteriellen Embolus, der aus der A. cerebri media eines Patienten geborgen wurde (1), einen nach dem hier vorgestellten Gerinnungsprotokoll generierten PRP-Thrombus (2), einen aus rekalkifiziertem Citratblut gewonnenen Thrombus (3) und einen spontaneronnenen Vollblutthrombus (4). Von links nach rechts sind histologische Schnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (A), einer Ladewig-Färbungen (B) sowie Schnitte mit Streptavidin-gelabelten Antikörpern gegen CD42 (für die Thromben 1 und 2) bzw. gegen CD61 (für die Thromben 3 und 4) zu sehen. Alle Schnitte sind in 100-facher Vergrößerung abgebildet. Während die Thromben 1 und 2 durch ein geschichtetes, farbiges Erscheinungsbild mit einem kräftigen Fibrinnetz gekennzeichnet sind, bestehen die Thromben 3 und 4 fast vollständig aus sedimentierten Erythrozyten mit einzelnen, verstreut liegenden Leukozyten. Schichten aus Fibrin, fragmentierten Erythrozyten, Leukozyten und Proteinen (\rightarrow), Fibrinnetz mit eingeschlossenen Proteinen und fragmentierten Erythrozyten (\uparrow), intakte Erythrozyten (\leftarrow). In der Ladewig-Färbung erscheint das Fibrin metachromatisch blau-violett, die mit Streptavidin markierten Thrombozyten fallen in den C-Präparaten durch ein gitterartiges Muster und disseminierte fleckförmige Farbsammlungen auf.

Die PRP-Thromben sind dabei den *in vivo* entstandenen Thromben sehr ähnlich. Bei den Thrombusarten gemeinsam ist ein starkes Fibrinnetz, in dem sich intakte Erythrozyten, Erythrozytenfragmente, Leukozyten sowie andere zelluläre und auch nicht-zelluläre Bestandteile nachweisen lassen. *In vivo*- und PRP-Thromben verbindet ein buntes, geschichtetes Erscheinungsbild. Als Unterscheidungsmerkmal zu den artifiziell entstandenen Thromben finden sich in physiologischen Thromben, als Zeichen einer unspezifischen Immunantwort, fokale Infiltrate neutrophiler Granulozyten. Im Gegensatz dazu bieten die spontangeronnenen Vollblutthromben und rekalkifizierten Citrat-Thromben der vom Pathologen gebildeten Gruppe III ein gänzlich anderes Bild: Sie bestehen fast ausschließlich aus sedimentierten, in der Regel intakten Erythrozyten. In der Ladewig-Färbung findet sich allenfalls ein spärlich ausgebildetes, feines und kaum sichtbares Fibrinnetz. Die Verteilung der angefärbten Leukozyten erinnert an den Ausstrich frischen Bluts. Thrombozyten, die mit dem CD61-Antikörper detektiert werden, tauchen lediglich vereinzelt oder in Form winziger Aggregate auf.

4.8. Qualitative Validierung des Messverfahrens

Zur Bestimmung der Thrombolyselose greift das vorgestellte Modell auf ein gänzlich neues Messverfahren zurück. Um die gewonnenen Ergebnisse zumindest qualitativ validiert werden können, sollen diese mit der weitverbreiteten und allgemein akzeptierten Methode der Gewichtsmessung verglichen werden.

Dazu wurden alle Thromben vor Beginn und nach Beendigung eines Thrombolyselosexperiments mit einer Präzisionswaage (Kern 770; Kern & Sohn GmbH, 72336 Balingen, Deutschland) gewogen und daraus die Gewichtsabnahme des Thrombus bestimmt.

Um Messfehler zu vermeiden, die durch einen Flüssigkeitsverlust der Thromben entstehen könnten, wurden die Thromben nach dem abgeschlossenen Gerinnungsprozess bzw. nach Versuchsende zum Wiegen in ein kleines Behältnis überführt, das mit einer isotonen Elektrolytlösung (Ringer-Lösung, Berlin-Chemie Menarini, Berlin, Deutschland) gefüllt war. Das zuvor gemessene Gewicht des Behältnisses und der Elektrolytlösung wurden zur Bestimmung des Thrombusgewichts vom Gesamtgewicht abgezogen. Die Thromben befanden sich also stets in einem flüssigen Milieu.

Die Genauigkeit der Gewichts-differenzbestimmung wurde außerdem dadurch gesteigert, dass jede Gewichtsmessung dreimal wiederholt und die Bestimmung der Gewichts-differenz aus den jeweils resultierenden Mittelwerten erfolgte.

Zusammenfassung:

In diesem Kapitel erfolgte eine umfassende Analyse des aufgebauten Versuchsstandes. Dabei konnte gezeigt werden, dass die hydrodynamischen Parameter des Modells definiert und gleichzeitig gut reproduzierbar einzustellen sind. Die Flussgeschwindigkeit der zirkulierenden Blutersatzlösung kann bis auf einen relativen Fehler von 0.04 % genau gemessen werden. Ihr Wert ist dabei nahezu unabhängig vom Füllungs-zustand des Thrombuskorbes (rel. Abweichung $< 0.8\%$) und verhält sich mit einer Abweichung von rund 0.6 %/h ausreichend stabil. Auch für die Druckmessung ließ sich eine hohe Präzision und bei mehrstündigen Testläufen auch eine ausreichende Konstanz nachweisen. Die in diesem Zusammenhang nachgewiesenen Fehler sind vernachlässigbar klein.

Der Thrombuskorb liefert eine streng monotone Beziehung zwischen dem Thrombusvolumen bzw. dem Füllungs-zustand des Korbes und der gemessenen Druckdifferenz. In Analogie zu verengten oder verschlossenen Blutgefäßen ist die Hydrodynamik im Bereich des Korbes weitgehend nichtlinear. Aufgrund der speziellen Form des Thrombuskorbes hat dieser einen geringen Eigenwiderstand und ermöglicht eine gute Differenzierung niedriger Lyseraten, was allerdings durch eine schlechte Auflösung subtotaler Lyseraten erkauft wird. Weiterhin gewährleistet der Korb die adäquate Applikation von Ultraschallwellen und thrombolytischen Substanzen.

Problematisch erscheint dagegen das Auftreten von Seitenflüssen bei einer hohen Druckbelastung des Korbes. Diese können zu einer Verfälschung des Lyseeffekts führen. Da jedoch selbst in diesem Druckbereich eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen besteht, relativiert sich dieses Problem beim Vergleich von Versuchen, die unter denselben hydrodynamischen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden.

Das Vorgehen bei der Datenauswertung erwies sich als sinnvoll. Es besteht im Wesentlichen aus einer Driftbereinigung sowie der Einführung der sogenannten normierten Druckdifferenz. Diese dimensionslose Größe erlaubt den Vergleich von Lyseraten unterschiedlich großer Thromben und den Vergleich von Experimenten, die mit unterschied-

lichen Flussverhältnissen durchgeführt wurden, sofern die zu erwartenden Lyseraten klein sind. Treten hohe Lyseraten im Rahmen von Versuchen mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten auf, sollten zur Bestimmung der Lyserate Umrechnungskurven eingesetzt werden.

Das entwickelte Gerinnungsverfahren produziert plättchenreiche Thromben mit einem starken Fibrinnetz. Die Thromben sind deshalb in der Lage, den pulsatischen Druck- und Flussverhältnissen des Systems standzuhalten. Gleichzeitig zeigen sie eine hohe histologische Übereinstimmung mit *in vivo* entstandenen Thromben.

Insgesamt ermöglicht also das Modell die Durchführung von Experimenten, die zumindest hinsichtlich der physikalisch zu erfassenden Parameter den realen Gegebenheiten einer sonothrombolytischen Behandlung entsprechen. Ob die so gewonnenen Ergebnisse zumindest qualitativ richtig sind, soll durch eine zusätzliche Bestimmung der Gewichtsreduktion der Thromben überprüft werden.

Im folgenden Kapitel erfolgt eine Beschreibung des ersten Sonothrombolyseversuchs und eine Diskussion der gewonnenen Versuchsergebnisse.

5. Der erste Sonothrombolyseversuch

Inhalt dieses Kapitels ist der erste Sonothrombolyseversuch, der mit dem Modell durchgeführt wurde. Der Versuch sollte in erster Linie die Betriebsfähigkeit des Modells demonstrieren und wurde nicht dazu konzipiert, die Funktionsweise der Sonothrombolyse systematisch zu erforschen. Dies soll das Ziel zukünftiger Experimente sein.

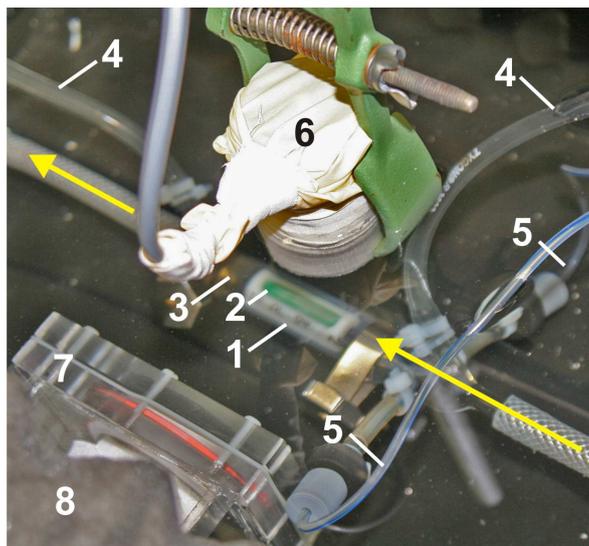


Abb. 5.1.: Montierter Thrombuskorb im Versuchsbecken. Ansicht von oben in das mit entgastem Wasser befüllte Becken. Thrombuskorb (1), Schallfenster (2), umhüllender Schlauch (3), Schlauchverbindung zu den Drucksensoren (4), Zuleitungen für Plasma und Thrombolytikum (5), Ultraschallkopf (6), seitliches Schallfenster mit Silikonfolie (7), ein Stück Schallabsorber (8), mit dem das gesamte Becken ausgekleidet ist, Strömungsrichtung der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit (gelbe Pfeile). Zur besseren Übersicht wurde der Schallkopf über dem Thrombuskorb montiert. Während eines Versuchs befindet er sich hinter dem Schallfenster (7). Korb und Beschallungsebene sind dann um 90° gekippt.

Der allgemeine Versuchsaufbau wurde bereits in Kapitel 3 detailliert beschrieben. Abbildung 5.1 zeigt den Teil des Aufbaus, wo sich der Thrombuskorb zusammen mit dem umhüllenden Schlauch innerhalb des Wasserbeckens befindet.

Verglichen wurde die Thrombolyse zweier Versuchsgruppen. In Gruppe A waren die

Thromben lediglich einer pulsatilen Strömung ausgesetzt. In Gruppe B erfolgte zusätzlich eine thrombolytische Behandlung mit Ultraschall und rt-PA (Actilyse[®], Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Deutschland). Für beide Gruppen wurden jeweils 5 Einzelversuche durchgeführt, in denen 4 Stunden lang die Druckdifferenz über dem Thrombuskorb gemessen wurde. Außerdem wurde das Gewicht der Thromben vor und nach dem Versuch und daraus deren Gewichtsveränderung bestimmt (vgl. Abschn. 4.8), um die Ergebnisse des neuen Messverfahrens qualitativ überprüfen zu können. Die Herstellung der PRP-Thromben beider Gruppen erfolgte gemäß des in Abschnitt 3.10 vorgestellten Gerinnungsprotokolls, wobei in Gruppe B die Inkubationszeit von zwei auf eine Stunde reduziert wurde, um zusätzlich die Auswirkungen einer verkürzten Retraktionsphase auf die Thrombolyse zu untersuchen. Makroskopisch und histologisch veränderten sich die PRP-Thromben dabei nicht. Die hydrodynamischen Rahmenbedingungen waren in beiden Gruppen identisch und simulierten vor Bestückung des Thrombuskorbes die Flussverhältnisse im C1-Segment der A. carotis interna eines Patienten mit arteriellen Hypertonus (Abb. 5.2).

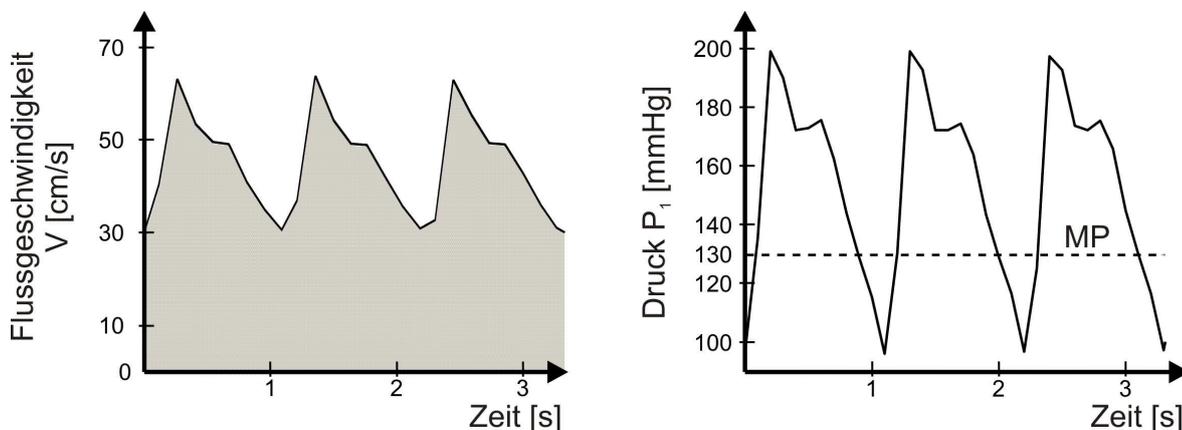


Abb. 5.2.: Hydrodynamische Rahmenbedingungen des Versuchs. Zu sehen sind die Flussgeschwindigkeits- und Druckverhältnisse vor dem noch ungefüllten Thrombuskorb. MP = Mitteldruck.

Die systolische und diastolische Flussgeschwindigkeit lag kurz vor dem Thrombuskorb bei 64 bzw. 29 cm/s. Über eine Adjustierung des Nadelventils wurde der systolische Spitzendruck vor dem Thrombuskorb auf knapp 200 mmHg und der arterielle Mitteldruck (MP) auf 130 mmHg eingestellt.

Die Thrombolyse der Gruppe B begann eine Stunde nach Versuchsstart in Form einer kombinierten Applikation aus Ultraschall und rt-PA und dauerte eine Stunde lang.

Das verwendete Ultraschallgerät und der gewählte Betriebsmodus wurden bereits in Abschnitt 3.8 vorgestellt. Der Abstand zwischen Ultraschallwandler und Thrombus betrug 50 mm und entspricht damit der typischen Eindringtiefe des transkraniellen Ultraschalls bei der Darstellung des M1-Segments der A. cerebri media. Das Sample volume des PW-Dopplers wurde in den Thrombus gelegt. Als Thrombolytikum wurden 80 ml eines Gemischs aus Plasma und rt-PA (Endkonzentration: 60 kU/ml) kontinuierlich mit 80 ml/h in den Thrombuskorb eingespritzt. Zur Festlegung der rt-PA-Konzentration wurde auf Experimente von Holland et al. zurückgegriffen. Diese zeigten, dass sich die Wirkung der rt-PA-induzierten Thrombolyse unter statischen Bedingungen ab einer rt-PA-Konzentration von rund 60 kU/ml nicht mehr signifikant steigern lässt [30]. Diese rt-PA-Konzentration wurde auch in unserem Flussmodell unter der Annahme verwendet, dass durch die kontinuierliche Applikation des Gemischs direkt in den Thrombuskorb hinein ein quasi konstantes Mikromilieu aus Plasma und rt-PA im Bereich des Thrombus entsteht (vgl. S. 30).

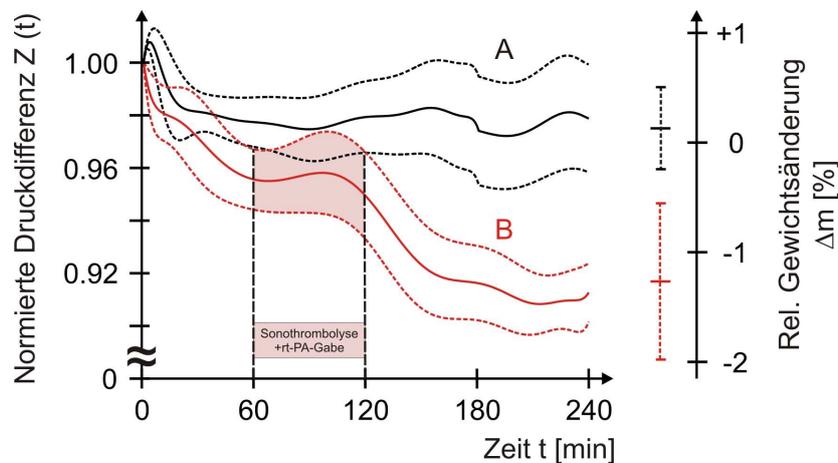


Abb. 5.3.: Effekt der rt-PA-unterstützten Sonothrombolyse. Verglichen mit den PRP-Thromben der Gruppe A, die lediglich der pulsatischen Strömung ausgesetzt waren, lässt sich in Gruppe B nach der kombinierten Ultraschall- und rt-PA-Applikation eine Abnahme der normierten Druckdifferenz und eine Reduktion des Thrombusgewichts feststellen. Die Inkubationszeit der Thromben aus Gruppe A betrug 2 Stunden, der aus Gruppe B lediglich eine Stunde. Die Versuchsergebnisse (Gruppe A: schwarz; Gruppe B: rot; jeweils $n=5$) sind als Mittelwert (durchgezogene Linien) und Standardfehler (gestrichelte Linie) dargestellt.

Das Vorgehen in Gruppe B sollte damit einem realistischen Szenario entsprechen, bei dem ein Schlaganfallpatient mit einem M1-Verschluss eine Stunde nach Beginn der Symptomatik systemisch lysiert und sonothrombolytisch behandelt wird. Abbildung 5.3 zeigt die Versuchsergebnisse.

Die Berechnung der normierten Druckdifferenz wurde in Abschnitt 4.6.3 erläutert. Aufgrund der Normierung liegt der Startwert eines Versuchs immer bei dem Wert 1 und entspricht dem noch unbeeinflussten Thrombus zu Beginn des Versuchs. Eine Abnahme des Werts im Verlauf der Messung zeigt eine Auflösung des Thrombus an. Im Fall einer vollständigen Thrombolyse läuft der Wert gegen Null.

Sowohl der kontinuierliche Verlauf der Druckdifferenz als auch der diskrete Wert der Gewichtsabnahme deuten einen Unterschied zwischen der Thrombolyse in Gruppen A und B an. Dieser ist statistisch betrachtet allerdings nicht signifikant¹. Die Auflösung der Thromben aus Gruppe A ist vernachlässigbar klein. Im Verlauf der ersten Minuten liegt der Mittelwert der normierten Druckdifferenz sogar kurzzeitig über dem Wert 1, bevor er sich bei rund 0.98 einpendelt. Der Mittelwert der Gewichtsänderung nimmt mit 0.13 % einen positiven Wert an, was theoretisch einer Gewichtszunahme entspricht, betragsmäßig und hinsichtlich der relativ großen Standardabweichung ($\pm 0.85\%$) jedoch zu vernachlässigen ist. Im Vergleich zu Gruppe A ist die Thrombolyse der Gruppe B nicht signifikant erhöht. Hier kommt es während der ersten Stunde zu einer geringfügig gesteigerten Auflösung, bevor die normierte Druckdifferenz für die folgenden 40 Minuten einen Plateauwert von knapp 0.96 erreicht. Gegen Ende der rt-PA- und Ultraschallbehandlung kommt es dann zu einem weiteren Abfall der normierten Druckdifferenz, die sich schließlich im Verlauf der letzten 60 Minuten bei rund 0.91 stabilisiert. Die mittlere Gewichtsänderung liegt bei -1.27 % (Standardabweichung: $\pm 1.62\%$).

Der initiale Anstieg des hydrodynamischen Widerstands der Thromben aus Gruppe A kommt vermutlich dadurch zustande, dass die anströmende Blutersatzflüssigkeit die Thromben in den Korb hineinpresst und diesen so dichter verschließt². Obgleich dieser Effekt auch in Gruppe B zu beobachten sein müsste, nimmt hier die normierte Druckdifferenz direkt von Beginn der Messung an eine Stunde lang kontinuierlich ab. Begründen lässt sich dieses Verhalten mit der verkürzten Inkubationszeit der PRP-Thromben aus Gruppe B, die zu einer geringeren Festigkeit der Thromben und zu einem entsprechend größeren Abrieb an der Thrombusoberfläche führt. Ob der nach rund 100 Minuten er-

¹Die Varianzanalyse (ANOVA) und der post hoc *t*-Test lieferten bei der Berechnung des Signifikanzniveaus für die Druckdifferenzdaten über den gesamten Zeitverlauf der Messung P-Werte größer 0.2. Für die Gewichtsabnahme ergab sich ein P-Wert von 0.12. Um trotzdem den Unterschied zwischen den beiden Gruppen herauszustellen, wurde in Abbildung 5.3 der Standardfehler dargestellt.

²Eine mechanische Verlegung der Bypasskanäle wurde ausgeschlossen (vgl. S. 66)

neut einsetzende Druckdifferenzabfall in Gruppe B wieder auf einen mechanischen Abrieb und/oder auf die thrombolytische Behandlung zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden ³. Dazu hätten zusätzlich Thromben der Gruppe B allein unter dem Einfluss der strömenden Flüssigkeit untersucht werden müssen. Aufgrund der nicht signifikant erhöhten Lyserate der Gruppe B wäre jedoch diese weiterführende Differenzierung nicht sinnvoll gewesen.

Zusammenfassung: Der erste Sonothrombolyseversuch zeigte keine signifikante Zunahme der Thrombolyse für PRP-Thromben unter der kombinierten Einwirkung von rt-PA und Ultraschall. Die trendmäßige Übereinstimmung zwischen Gewichts- und Druckdifferenzveränderung spricht aber eindeutig für die Funktionstüchtigkeit des Versuchsaufbaus. Im nächsten Kapitel werden die Stärken und Schwächen des Modells abschließend zusammengefasst und Lösungsansätze für bestehende Probleme vorgestellt.

³Mit Beginn der Sonothrombolyse sind die Gruppen A und B wegen der unterschiedlichen Inkubationszeiten ihrer Thromben nicht mehr direkt vergleichbar.

6. Diskussion

Nach Stand der Literatur vom September 2011, die vom National Center for Biotechnology Information der U.S. National Library of Medicine (8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA) zusammengetragen wird ¹, konnte mit dem vorgestellten Versuchstand das weltweit erste Modell realisiert werden, das in der Lage ist, Versuche zur Sonothrombolyse unter physiologischen Flussverhältnissen kontaktfrei und zeitkontinuierlich durchzuführen.

Die umfassende Analyse des Modells in Kapitel 4 zeigte, dass die einzelnen Komponenten des Aufbaus auch über lange Versuchszeiten hinweg sehr verlässliche und präzise Daten liefern. Trotz der nichtlinearen Eigenschaften des Modells gestattet die Datennachverarbeitung auch den Vergleich zwischen Versuchen, die unter verschiedenen hydrodynamischen Bedingungen durchgeführt werden. Dadurch entsteht ein hohes Maß an Flexibilität hinsichtlich der Versuchsplanung. Die Funktionstüchtigkeit des gesamten Messplatzes ließ sich in Kapitel 5 anhand eines Sonothrombolyseversuchs nachweisen. Die Validierung der vorgestellten Versuchsergebnisse wird allerdings durch die Tatsache erschwert, dass sowohl das Modell als auch der eingesetzte Thrombus bislang einzigartige Artefakte darstellen. Die qualitative Beurteilung der neuen Messmethode gelingt also nur innerhalb des Modells durch Vergleich mit einem bereits akzeptierten Messverfahren. Deshalb wurde im Rahmen des Sonothrombolyseversuchs die Thrombolyse zusätzlich über eine Gewichtsmessung bestimmt. Die Schlussfolgerungen, die sich zum einen aus der neuartigen Bestimmung der normierten Druckdifferenz und zum anderen aus der herkömmlichen Gewichtsreduktionsmessung ergaben, stimmen dabei erfreulicherweise überein. Aufgrund der unterschiedlichen Messgrößen und des nicht signifikanten Lyseeffekts ist allerdings eine weiterführende Beurteilung nicht möglich.

¹Zugang erhält man über die Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Tag des letzten Zugriffs: 25.09.2011).

Die geringen Lyseraten des ersten Sonothrombolyseversuchs können auf drei mögliche Ursachen zurückgeführt werden:

1. In erster Linie wird das Ausmaß der Lyse durch die Beschaffenheit der untersuchten Thromben bestimmt [52]. Die Thromben des Modells wurden aus plättchenreichem Plasma (PRP) hergestellt und weisen deshalb eine hohe Thrombozytendichte und ein starkes Fibrinnetz auf. Sie sind entsprechend hart und halten selbst hohen Scherkräften stand. Inkubiert man diese Thromben zwei Stunden lang bei 37°C in einer Lösung aus gepuffertem Plasma (pH = 7.4) und rt-PA (Endkonzentration = 60 kU/ml) beträgt die relative Gewichtsreduktion lediglich 17 %. In Übereinstimmung mit Mizushige et al. [38], die von niedrigen Lyseraten bei Untersuchungen mit artifiziell hergestellten weißen Thromben berichten, ist das sehr wenig verglichen mit einer Gewichtsreduktion von 64 %, die wir unter den gleichen Versuchsbedingungen für Thromben aus spontangeronnenem Vollblut fanden. Vermutlich repräsentieren also die von uns benutzten PRP-Thromben solche Blutgerinnsel, die in der Klinik zu einem unzureichenden Erfolg der Lysetherapie und damit zu einem schlechten Outcome des Patienten führen [65]. Diese These wird durch die auf S. 72 vorgestellte histologische Untersuchung untermauert: Sie zeigt eine hohe Übereinstimmung zwischen den von uns generierten PRP-Thromben und den mittels mechanischer Extraktionsverfahren geborgenen *in vivo* Thromben. Die mechanische Extraktion erfolgte nachdem durch eine systemische Thrombolyse keine klinische Verbesserung für den Patienten erzielt werden konnte. Die Thromben, die für unsere Versuche angefertigt werden, ähneln also hinsichtlich ihrer Struktur und histologischen Zusammensetzung solchen Thromben, die durch eine systemische Thrombolyse vermutlich nur geringfügig oder überhaupt nicht aufgelöst werden können.

Die gut lysierbaren Thromben aus spontangeronnenem Vollblut werden von vielen Arbeitsgruppen für Experimente eingesetzt, die unter statischen Bedingungen oder unphysiologisch niedrigen Flussverhältnissen stattfinden [30, 43]. Wie in Abschnitt 4.7.1 gezeigt werden konnte, eignen sich diese Thromben allerdings nicht für Versuche mit physiologischen Flussgeschwindigkeiten. Sie zerfallen binnen weniger Sekunden unter den einwirkenden Scher- und Reibungskräften. Es

ist daher fraglich, ob diese Thromben überhaupt zu einem dauerhaften Gefäßverschluss und somit zu einer klinisch relevanten zerebralen Ischämie führen können. Die Generierung brauchbarer Thromben, die einerseits den pulsatilen Strömungsverhältnissen einen ausreichend hohen und dauerhaften Widerstand entgegensetzen und andererseits eine signifikante Lyserate aufweisen, ist damit von entscheidender Bedeutung und wird das Ziel weiterführender Experimente sein. So könnte beispielsweise bei der Herstellung der PRP-Thromben ein Teil des plättchenreichen Plasmas durch einfaches Plasma ersetzt werden, um die Thrombozytenkonzentration wieder zu reduzieren. Außerdem besteht die Hoffnung, über eine Vergrößerung der bereits in Abschnitt 4.7.2 erwähnten Sammlung von *in vivo* Thromben, weitere Hinweise auf die Zusammensetzung der nachzubildenden Gerinnsel gewinnen zu können.

2. Vermutlich ist die Menge des eingespritzten rt-PAs und möglicherweise auch die des Plasmas zu gering, um eine ausreichende Thrombolyse zu induzieren. Die verwendete rt-PA-Konzentration basiert zwar auf experimentell erhobenen Daten [30], setzt aber voraus, dass der Thrombus unter statischen Bedingungen lysiert wird. Ob diese Voraussetzung tatsächlich durch die gewählte Applikationsform des rt-PAs (vgl. S. 30) erfüllt wird, ist nicht sicher. Es ist nicht bekannt, wie schnell das Gemisch aus rt-PA und Plasma durch die zirkulierende Blutersatzflüssigkeit aus dem Thrombuskorb fortgespült wird und ob es durch den Kontakt mit den Oberflächen des übrigen Versuchsstandes inaktiviert bzw. durch Absorption dem Kreislauf entzogen wird. Für den Fall, dass das applizierte Gemisch aus rt-PA und Plasma direkt aus dem Thrombuskorb herausgespült wird und sich gleichmäßig innerhalb der gesamten zirkulierenden Blutersatzlösung verteilt, ist die rt-PA-Konzentrationen im Flussmodell am Ende eines Versuchs unter Vernachlässigung der Halbwertszeit des rt-PAs jedenfalls deutlich niedriger als die rt-PA-Konzentration, die im Blut eines erwachsenen Patienten nach einer systemischen Thrombolyse vorliegt ². Eine Anhaftung oder Inaktivierung des rt-PA-

²Bei der systemischen Thrombolyse eines 80 kg schweren Patienten werden leitliniengerecht insgesamt 72 mg rt-PA eingesetzt. Ein Milligramm entsprechen 600 kU rt-PA. Bei einem Blutvolumen von rund 6 Litern ergibt sich damit am Ende der Thrombolyse eine rt-PA-Konzentration von 7200 U/ml. Bei den Versuchen im Flussmodell wurden 80 ml eines Gemischs aus rt-PA und Plasma mit einer rt-PA-Konzentration von 60 kU/ml in 989 ml zirkulierende Blutersatzflüssigkeit injiziert. Die Konzentration des rt-PAs am Ende des Versuchs liegt also bei lediglich 4490 U/ml.

Plasma-Gemischs an den Oberflächen des Versuchsstands würde die Thrombolyse im Modell zusätzlich verringern.

Um die geeigneten rt-PA und Plasamengen herauszufinden, bieten sich Experimente mit zunächst kleinen Flussgeschwindigkeit an, für die über Dosisfindungsversuche die notwendige rt-PA- und Plasma-Menge für eine suffiziente Lyse ermittelt wird. Anschließend sollte die Flussgeschwindigkeit schrittweise erhöht werden bis wieder physiologische Werte vorliegen. Dabei muss die Menge des injizierten Gemischs gesteigert werden, sobald die Lyserate sinkt.

3. Schließlich ist denkbar, dass die Dämpfung des eingestrahlt Ultraschalls zu hoch ist. Zwar lieferten entsprechende Messungen sinnvolle Werte (vgl. Abschn. 4.5), doch dürfen diese Werte nicht ohne weiteres mit den zur Verfügung stehenden Literaturdaten verglichen werden. Über eine Reduktion der Wanddicke des Schlauchs, der den Thrombuskorb umhüllt, könnte jedoch nötigenfalls eine Erhöhung der Ultraschallenergie am Thrombus erzielt werden.

Eine Steigerung der bislang unzureichenden Lyserate scheint also durch eine Optimierung des Thrombus und eine Verbesserung des Lyseverfahrens möglich zu sein.

Physiologische Systeme lassen sich niemals in allen Details vollständig und exakt modellieren. Auch das hier vorgestellte Modell weist derzeit noch drei Schwachstellen auf:

1. Durch die Verwendung einer Blutersatzlösung wird die autolytische Wirkung des Bluts vernachlässigt. Die gerinnungsinduzierenden Kontaktflächen des Modells lassen jedoch den Einsatz von humanem Vollblut als zirkulierende Flüssigkeit nicht zu [16]. Die Verwendung von antikoaguliertem Blut kommt ebenfalls nicht in Frage, weil dadurch das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System zu stark verändert würde [47]. Immerhin sollte durch die direkte Applikation des Plasmas in den Korb der Thrombus permanent von einem Plasmafilm umgeben sein. Dieses Mikromilieu soll eine physiologische Wechselwirkung zwischen dem Thrombus und den Substraten des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems ermöglichen.
2. Das Modell berücksichtigt nicht die Interaktion zwischen Thrombus und Gefäßwand. Der Einfluss dieser vermutlich eher trägen Wechselwirkung auf eine therapeutisch induzierte Thrombolyse, deren Ziel die kurzfristige Auflösung des Thrombus ist, dürfte jedoch gering sein.

-
3. Das Schlauchsystem des Modells besteht bislang nur aus einem Kreislauf, der die A. carotis interna und, in Kombination mit dem Thrombuskorb, die verschlossene A. cerebri media sowie die übrigen, noch offenen basalen Hirnarterien simuliert. Durch ein zweites, parallel zum Thrombuskorb verlaufendes und mit einem Nadelventil versehenes Schlauchstück, ließe sich das Gefäßsystem der A. carotis externa darstellen, wodurch sich vor dem thrombusgefüllten Korb noch realistischere Flussgeschwindigkeitskurven einstellen ließen.

Zu den erfassten Daten und deren Nachverarbeitung ist folgendes anzumerken:

- In der Klinik wird der Erfolg einer Lysetherapie über das Outcome des Patienten sowie über die duplexsonographisch erfasste Rekanalisationsrate des verschlossenen Gefäßes definiert. Der klinische Verlauf eines Patienten wird sich jedoch mit keinem Modell sicher vorhersagen lassen. Dagegen lässt sich mit Hilfe des vorliegenden Messstands eine Aussage über die Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes treffen, da das Prinzip des Modells auf der Bestimmung des Flusswiderstands des Thrombus beruht. Sofern die Beschallung des Thrombus duplexsonographisch erfolgt, kann diese Aussage zusätzlich mit dem ermittelten TIBI-Score [14] korreliert werden. In jedem Fall liefert die hier vorgestellte Messung hydrodynamischer Zustandsgrößen klinisch relevantere Daten, als die meisten bislang üblichen Verfahren, in denen das Thrombusgewicht oder die Verteilung radioaktiver Zerfallsprodukte bestimmt werden (vgl. Kapitel 2).
- Bei einer starken Druckbelastung des Schlauchsystems können die auf Seite 54 erwähnten Seitenflüsse zu einem Absinken der gemessenen Druckdifferenz und somit zu einer Überschätzung des Lyseeffekts führen. Aufgrund der weiterhin hohen Reproduzierbarkeit der Messungen ergeben sich daraus allerdings nur Probleme bei einem Vergleich von Versuchen mit unterschiedlich hohen Flussgeschwindigkeiten. Grundsätzlich sollte dieses Problem aber durch eine starre Ummantelung des Thrombuskorbes und des umhüllenden Schlauchstücks auszuschalten sein.
- Die in Abschnitt 4.6.2 vorgestellte Driftbereinigung der aufgezeichneten Druckdifferenzen ist aus mathematischer Sicht nicht hundertprozentig korrekt, da hierbei Werte unabhängiger Messungen miteinander verrechnet werden.

- Das Modell ist derzeit nicht in der Lage, zwischen einer mechanischen und einer enzymatisch bedingten Lyse zu unterscheiden. Zukünftig soll daher aus der zirkulierenden Blutersatzflüssigkeit eine D-Dimerbestimmung erfolgen, um das Ausmaß der enzymatischen Lyse feststellen zu können.

Alles in allem treten die überschaubaren und z.T. auch leicht ausschaltbaren Schwächen des Modells deutlich hinter den enormen Vorteilen der entwickelten Methode zurück. Durch den vorgestellten Versuchsstand sind erstmals in der Geschichte der Sonothrombolyseforschung *in vitro* Experimente unter physiologischen Flussbedingungen möglich. Die hydrodynamischen Parameter lassen sich dabei sehr genau einstellen und zuverlässig kontrollieren. Der Versuchsplanung sind in Bezug auf die Applikation von Ultraschall und thrombolytischen Substanzen keinerlei Grenzen gesetzt.

Die Bestimmung der Thrombolyse erfolgt über die Druckdifferenz, die über den mit einem Thrombus gefüllten Korb anliegt. Auf diese Weise sind hochauflösende und zeitkontinuierliche Messungen möglich, ohne den Versuchsablauf oder den Prozess der Thrombolyse stören zu müssen.

Gerade der zuletzt genannte Vorteil lässt sich sehr gut anhand der in Kapitel 5 vorgestellten Ergebnisse demonstrieren: Während in Abbildung 5.3 die weit verbreitete Methode der Gewichts-differenzmessung lediglich einen Einzelwert für den vierstündigen Sonothrombolyseversuch liefert, erzeugt das neu entwickelte Verfahren eine ganze Kurve aus kontinuierlich aufgezeichneten Daten, die eine Analyse des zeitlichen Ablaufs der Thrombolyse ermöglicht. Auf diese Weise könnten zukünftig unterschiedliche Therapiekonzepte hinsichtlich der Applikationsreihenfolge und -dauer der eingesetzten Thrombolytika und Ultraschallwellen miteinander verglichen werden. Um dies auch nur annähernd mit einer Gewichtsmessung leisten zu können, müsste der Thrombus wiederholt aus dem Versuchsstand entnommen werden, wodurch der Prozess der Thrombolyse immer wieder unterbrochen und maßgeblich beeinträchtigt würde.

Schließlich sollte noch darauf hingewiesen werden, dass die erhaltenen Daten während eines Versuchs online graphisch dargestellt werden und somit der Untersucher den Versuchsablauf bzw. die gewählte Lysestrategie jederzeit kontrolliert modifizieren kann.

7. Zusammenfassung

Die potentiellen Einsatzmöglichkeiten der Sonothrombolyse bei der Behandlung akut verschlossener Hirnarterien sind enorm, da diese Technik nicht-invasiv, preisgünstig, nahezu überall verfügbar und bei einem großen Patientenkollektiv anwendbar ist. Obgleich sich ihre Wirksamkeit bereits klinisch belegen ließ, sind die zugrunde liegenden Wirkmechanismen bislang nur unzureichend bekannt. Die Leistungsfähigkeit dieser vielversprechenden Methode konnte deshalb noch nicht ausgeschöpft werden. Da die Sonothrombolyse bei einer ungünstigen Parameterwahl allerdings auch zu intrakraniellen Blutungen führen kann, sollten Experimente zur Optimierung der Parameter zunächst nur an Modellen durchgeführt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein *in vitro* Modell entwickelt, das sich aufgrund eines vollkommen neuen Messverfahrens in hervorragender Weise für solche Untersuchungen eignet. Erstmals können nun Thrombolyseexperimente unter physiologischen und präzise einstellbaren Flussverhältnissen durchgeführt und Messdaten zeitkontinuierlich und für den Thrombolyseprozess störungsfrei erhoben werden. Gemessen wird dabei die Druckdifferenz, die durch den hydrodynamischen Widerstand des Thrombus in einem speziell konstruierten Thrombuskorb entsteht. Diese Druckdifferenz ist mit der Lyserate über eine komplexe, streng monotone, nichtlineare Beziehung verknüpft, die im Rahmen der Arbeit experimentell ermittelt und mathematisch diskutiert wurde. Schließlich gewährleistet eine adäquate Applikationsweise von Ultraschallwellen und thrombolytischen Substanzen die Durchführung von Sonothrombolyseversuchen, bei denen alle physikalisch fassbaren Parameter kontrolliert und definiert verändert werden können.

Mit Hilfe eines ersten Sonothrombolyseversuchs wurde die Betriebsfähigkeit des Modells überprüft. Dabei wurden die Flussparameter so gewählt, dass die hydrodynamischen

sche Situation am thrombusgefüllten Korb den hämodynamischen Verhältnissen bei einer embolisch verschlossenen A. cerebri media *in vivo* entspricht. Die Versuchsergebnisse zeigten eine qualitative Übereinstimmung zwischen den erhobenen Druckdifferenzwerten und den zur Validierung des Modells gemessenen Gewichtsabnahmen der Thromben, was eindeutig für die Funktionstüchtigkeit des neuartigen Versuchsaufbaus spricht. Unter der kombinierten Einwirkung von rt-PA und Ultraschall ließ sich dabei jedoch keine signifikante Zunahme der Thrombolyse nachweisen, was in erster Linie auf die hohe Festigkeit der *in vitro* erzeugten Thromben zurückzuführen ist. Aus physiologischen Gründen wurden diese aus plättchenreichem Plasma hergestellt und wiesen histologische Ähnlichkeit mit *in vivo* entstandenen Thromben auf, die sich unter einer systemischen Thrombolysbehandlung der Patienten nur unzureichend auflösen ließen. Durch eine Modifikation der artifiziellen Thromben ist zukünftig mit einer höheren Lyserate zu rechnen, wodurch auch eine abschließende quantitative Validierung des Modells möglich sein wird.

Dank des entwickelten Modells lassen sich nun erstmals die Einflüsse von hydrodynamischen Größen, Ultraschallparametern und Thrombolytika auf die Thrombolyse zeitkontinuierlich und störungsfrei beurteilen. Auf diese Weise wird es zukünftig möglich sein, die zeitliche Dynamik und Effizienz unterschiedlicher Sonothrombolysstrategien zu analysieren und deren Parameter zu optimieren. Das Modell wird dadurch einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Therapie akuter Schlaganfälle leisten.

Literaturverzeichnis

- [1] Aaslid R. *Transcranial Doppler sonography*. Springer, Berlin, (1986).
- [2] Alexandrov AV. Current and future recanalization strategies for acute ischemic stroke. *Journal of Internal Medicine*, 267:209–219, (2010).
- [3] Alexandrov AV, Burgin WS, Demchuk AM, El-Mitwalli A, Grotta JC. Speed of intracranial clot lysis with intravenous tissue plasminogen activator therapy. *Circulation*, 103:2897–2902, (2001).
- [4] Alexandrov AV, Demchuk AM, Felberg RA, Christou I, Barber PhA, Burgin WS, Malkoff M, Wojner AW, Grotta JC. High rate of complete recanalization and dramatic clinical recovery during tPA infusion when continuously monitored with 2-MHz transcranial Doppler monitoring. *Stroke*, 31:610–614, (2000).
- [5] Alexandrov AV, Molina CA, Grotta JC, Garami Z, Ford SR, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Saqqur M, Demchuk AM, Moyé LA, Hill MD, Wojner AM. Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 351:2170–2178, (2004).
- [6] Behrens S, Daffertshofer M, Spiegel D, Hennerici M. Low-frequency, low-intensity ultrasound accelerates thrombolysis through the skull. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 25:269–273, (1999).
- [7] Behrens S, Spengos K, Daffertshofer M, Schroeck H, Dempfle CE, Hennerici M. Transcranial ultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 27:1683–1689, (2001).
- [8] Blinc A, Francis CW, Trudnowski JL, Carstensen EL. Characterization of ultrasound-potentiated fibrinolysis in vitro. *Blood*, 81:2636–2643, (1993).

- [9] Braaten JV , Goss RA , Francis CW. Ultrasound reversibly disaggregates fibrin fibers. *Thrombosis & Haemostasis*, 78:1063–1068, (1997).
- [10] Cintas P, Le Traon AP, Larrue V. High rate of recanalization of middle cerebral artery occlusion during 2-MHz transcranial color-coded Doppler continuous monitoring without thrombolytic drug. *Stroke*, 33:626–628, (2002).
- [11] Cintas P, Nguyen F, Boneu B, Larrue V. Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2:1163–1166, (2004).
- [12] Daffertshofer M, Gass A, Ringleb P, Sitzler M, Sliwka U, Els Th, Sedlaczek O, Koroshetz WJ, Hennerici MG. Transcranial low-frequency ultrasound-mediated thrombolysis in brain ischemia. *Stroke*, 36:1441–1446, (2005).
- [13] Datta S, Coussios CC, Ammi AY, Mast TD, de Courten-Myers GM, Holland CK. Ultrasound-enhanced thrombolysis using Definity as a cavitation nucleation agent. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 34:1421–1433, (2008).
- [14] Demchuk AM, Burgin WS, Christou I, Felberg RA, Barber PA, Hill MD, Alexandrov AV. Thrombolysis in brain ischemia (TIBI) transcranial Doppler flow grades predict clinical severity, early recovery, and mortality in patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*, 32:89–93, (2001).
- [15] Devcic-Kuhar B, Pfaffenberger St, Gherardini L, Mayer Ch, Gröschl M, Kaun Ch, Benes E, Tschachler E, Huber K, Maurer G, Wojta J, Gottsauner-Wolf M. Ultrasound affects distribution of plasminogen and tissue-type plasminogen activator in whole blood clots in vitro. *Thrombosis and Haemostasis*, 92:980–985, (2004).
- [16] Edmunds LH Jr. Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *Journal of Cardiac Surgery*, 8:404–410, (1993).
- [17] Eggers J, König IR, Koch B, Händler G, Seidel G. 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*, 39:1470–1475, (2008).
- [18] Eggers J, Seidel G, Koch B, König IR. Sonothrombolysis in acute ischemic stroke for patients ineligible for rt-PA. *Neurology*, 64:1052–1054, (2005).

- [19] Eyding J, Hölscher Th, Postert Th. Transkranielle Neurosonologie beim akuten Schlaganfall: Fortschritte in Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*, 104:340–345, (2007).
- [20] Francis CW. Ultrasound-enhanced thrombolysis. *Echocardiography*, 18:239–246, (2001).
- [21] Francis CW, Blinc A, Lee S, Cox Ch. Ultrasound accelerates transport of recombinant tissue plasminogen activator into clots. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 21:419–424, (1995).
- [22] Francis CW, Ölundarson PT, Carstensen EL, Blinc A, Meltzer RS, Schwarz K, Marder VJ. Enhancement of fibrinolysis in vitro by ultrasound. *Journal of Clinical Investigations*, 90:2063–2068, (1992).
- [23] Frenkel V, Oberoi J, Stone MJ, Park M, Deng C, Wood BJ, Neeman Z, Horne M 3rd, Li KC. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances thrombolysis in an in-vitro model. *Radiology*, 239:86–93, (2006).
- [24] Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *New England Journal of Medicine*, 359:938–949, (2008).
- [25] Grabska K, Niewada M, Sarzyńska-Długosz I, Kamiński B, Członkowska A. Pulse pressure-independent predictor of poor early outcome and mortality following ischemic stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 27:187–192, (2009).
- [26] Greenberg RK, Ouriel K, Srivastava S, Shortell C, Ivancev K, Waldman D, Illig K, Green R. Mechanical versus chemical thrombolysis: an in-vitro differentiation of thrombolytic mechanisms. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 11:199–205, (2000).
- [27] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine*, 359:1317–1329, (2008).
- [28] Harpaz D, Chen X, Francis CW, Marder VJ, Meltzer RS. Ultrasound enhancement of thrombolysis and reperfusion in-vitro. *Journal of the American College of Cardiology*, 21:1507–1511, (1993).

- [29] Hölscher T, Raman R, Ernström K, Parrish J, Le DT, Lyden PD, Mattrey RF. In vitro sonothrombolysis with duplex ultrasound: first results using a simplified model. *Cerebrovascular Diseases*, 28:365–370, (2009).
- [30] Holland ChK, Vaidaya SS, Datta S, Coussios CC, Shaw GJ. Ultrasound-enhanced tissue plasminogen activator thrombolysis in an in vitro porcine clot model. *Thrombosis Research*, 121:663–673, (2008).
- [31] Jirka GH. *Einführung in die Hydromechanik*. KIT Scientific Publishing, Karlsruhe, (2007).
- [32] Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschoutto HO, Olsen TS. Acute stroke care and rehabilitation: an analysis of the direct cost and its clinical and social determinants. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke*, 28:1138–1141, (1997).
- [33] Kleindorfer D, Xu Y, Moomaw CJ, Khatri P, Adeoye O, Hornung R. US geographic distribution of rt-PA utilization by hospital for acute ischemic stroke. *Stroke*, 40:3580–3584, (2009).
- [34] Kwan D, Dries A, Burton T, Bhandari G, Young D, Green R, Ouriel K, Greenberg RK. Thrombus characterization with intravascular ultrasound: potential to predict successful thrombolysis. *Journal of Endovascular Therapy*, 10:90–98, (2003).
- [35] Lauer CG, Burge R, Tang DB, Bass BG, Gomez ER, Alving BM. Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation*, 86:1257–1264, (1992).
- [36] Leys D, Ringelstein EB, Kaste M, Hacke W, Executive Committee of the European Stroke Initiative. Facilities available in European hospitals treating stroke patients. *Stroke*, 38:2985–2991, (2007).
- [37] Maxwell L, Collocut T, Gledhill M, Sharma S, Edgar S, Gavin JB. The augmentation of leucocyte adhesion to endothelium by therapeutic ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 20:383–390, (1994).
- [38] Mizushige K, Kondo I, Ohmori K, Hirao K, Matsuo H. Enhancement of ultrasound-accelerated thrombolysis by echo contrast agents: dependence on microbubble structure. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 25:1431–1437, (1999).

- [39] Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas JF, Alvarez-Sabín J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke*, 32:1079–1084, (2001).
- [40] Molina CA, Ribo M, Rubiera M, Montaner J, Santamarina E, Delgado-Mederos R, Huertas R, Purroy F, Alvarez-Sabín J. Microbubble administration accelerates clot lysis during continuous 2-MHz ultrasound monitoring in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Stroke*, 37:425–429, (2006).
- [41] Mori E, Yoneda Y, Tabuchi M, Yoshida T, Ohkawa S, Ohsumi Y, Kitano K, Tsutsumi A, Yamadori A. Intravenous recombinant tissue plasminogen activator in acute carotid artery territory stroke. *Neurology*, 42:976–982, (1992).
- [42] Mutch NJ, Thomas L, Moore NR, Lisiak KM, Booth NA. TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5:812–817, (2007).
- [43] Nedelmann M, Brandt Ch, 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*, 20:18–22, (2005).
- [44] Nedelmann M, Eicke MB, Nolle F, Lierke EG, Kempfski O. Ultraschallkontrastmittel Levovist steigert den thrombolytischen Effekt von niederfrequentem Ultraschall. *Medizinische Klinik*, 97:216–220, (2002).
- [45] Nilsson AM, Odselius R, Roijer A, Olsson SB. Pro- and antifibrinolytic effects of ultrasound on streptokinase-induced thrombolysis. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 21:833–840, (1995).
- [46] Olsson SB, Johansson B, Nilsson AM, Olsson C, Roijer A. Enhancement of thrombolysis by ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 20:375–382, (1994).
- [47] Paparella D, Semeraro F, Scrascia G, Galeone A, Ammollo CT, Kounakis G, de Luca Tupputi Schinosa L, Semeraro N, Colucci M. Coagulation-fibrinolysis changes during off-pump bypass: effect of two heparin doses. *The Annals of Thoracic Surgery*, 89:421–427, (2010).
- [48] Perren F, Loulidi J, Poglia D, Landis T, Sztajzel R. Microbubble potentiated transcranial duplex ultrasound enhances IV thrombolysis in acute stroke. *Journal*

- of Thrombosis and Thrombolysis*, 25:219–223, (2008).
- [49] Pfaffenberger ST, Devcic-Kuhar B, Kollmann Ch, Kastl StP, Kaun Ch, Speidl WS, Weiss ThW, Demyanets S, Ullrich R, Sochor H, Wöber Ch, Zeitlhofer J, Huber K, Gröschl M, Benes E, Maurer G, Wojta J, Gottsauner-Wolf M. Can a commercial diagnostic ultrasound device accelerate thrombolysis? An in vitro skull model. *Stroke*, 36:124–128, (2005).
- [50] Rha JH, Saver JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke*, 38:967–973, (2007).
- [51] Rosenschein U, Furman V, Kerner E, Fabian I, Bernheim J. Ultrasound imaging-guided non-invasive ultrasound thrombolysis. *Circulation*, 102:238–245, (2000).
- [52] Sakharov DV, Rijken DC. The effect of flow on lysis of plasma clots in a plasma environment. *Thrombosis & Haemostasis*, 83:469–474, (2000).
- [53] Schneider F, Gerriets T, Walberer M, Mueller 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*, 37:1301–1306, (2006).
- [54] Serša I, Vidmar J, Grobelnik B, Mikac U, Tratar G, Blinc A. Modelling the effect of laminar axially directed blood flow on the dissolution of non-occlusive blood clots. *Physics in Medicine and Biology*, 52:2969–2985, (2007).
- [55] Siddiqi F, Blinc A, Braaten J, Francis CW. Ultrasound increases flow through fibrin gels. *Thrombosis & Haemostasis*, 73:495–498, (1995).
- [56] Siddiqi F, Odrlijin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound. *Blood*, 91:2019–2025, (1998).
- [57] Soltani A, Volz KR, Hansmann DR. Effect of modulated ultrasound parameters on ultrasound-induced thrombolysis. *Phys Med Biol*, 53:6837–6847, (2008).
- [58] Spengos K, Behrens S, Daffertshofer M, Dempfle CE, Hennerici M. Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 26:889–895, (2000).
- [59] Stride E. Physical principles of microbubbles for ultrasound imaging and therapy.

- Cerebrovascular Diseases*, 27:1–13, (2009).
- [60] Suchkova V, Siddiqi FN, Carstensen EL, Dalecki D, Child S, Francis CW. Enhancement of fibrinolysis with 40-kHz ultrasound. *Circulation*, 98:1030–1035, (1998).
- [61] The National Institute of Neurological Disorders and Stroke, rt-PA Stroke Study Group. Tissue Plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333:1581–1587, (1995).
- [62] Tiukinhoy-Laing SD, Huang S, Klegerman M, Holland ChK, McPherson DD. Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thrombosis Research*, 119:777–784, (2007).
- [63] Trübestein G, Engel F, Etzel F, Sobbe A, Cremer H, Stumpff U. Thrombolysis by ultrasound. *Clinical Science & Molecular Medicine*, 51:697–698, (1976).
- [64] Tsivgoulis G, Saqqur M, Sharma VK, Lao AY, Hill MD, Alexandrov AV. Association of pretreatment blood pressure with tissue plasminogen activator-induced arterial recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke*, 38:961–966, (2007).
- [65] Wunderlich MT, Goertler M, Postert T, Schmitt E, Seidel G, Gahn G, Samii C, Stolz E. Recanalization after intravenous thrombolysis. Does a recanalization time window exist? *Neurology*, 68:1364–1368, (2007).
- [66] Yagita Y, Etani H, Handa N, Itoh T, Imuta N, Okamoto M, Matsumoto M, Kinoshita N, Nukada T. Effect of transcranial Doppler intensity on successful recording in Japanese patients. *Ultrasound Med Biol*, 22:701–705, (1996).

A. Anhang

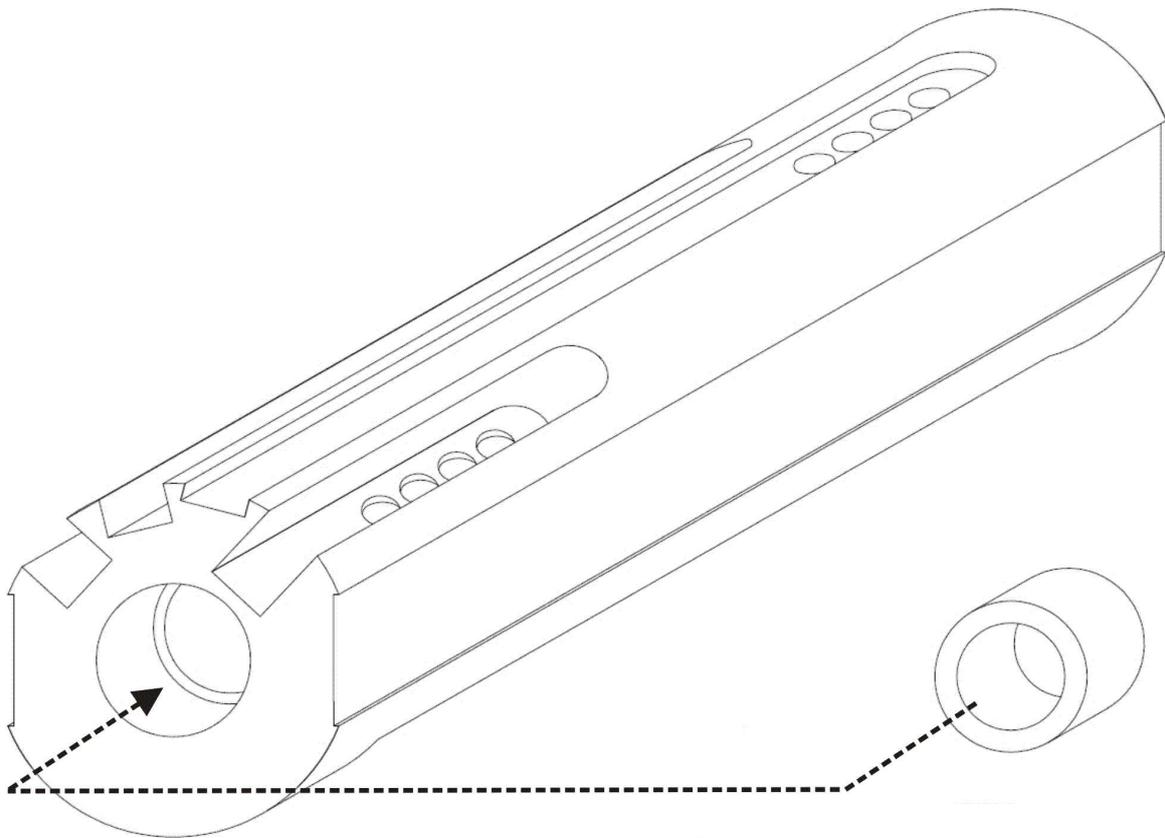
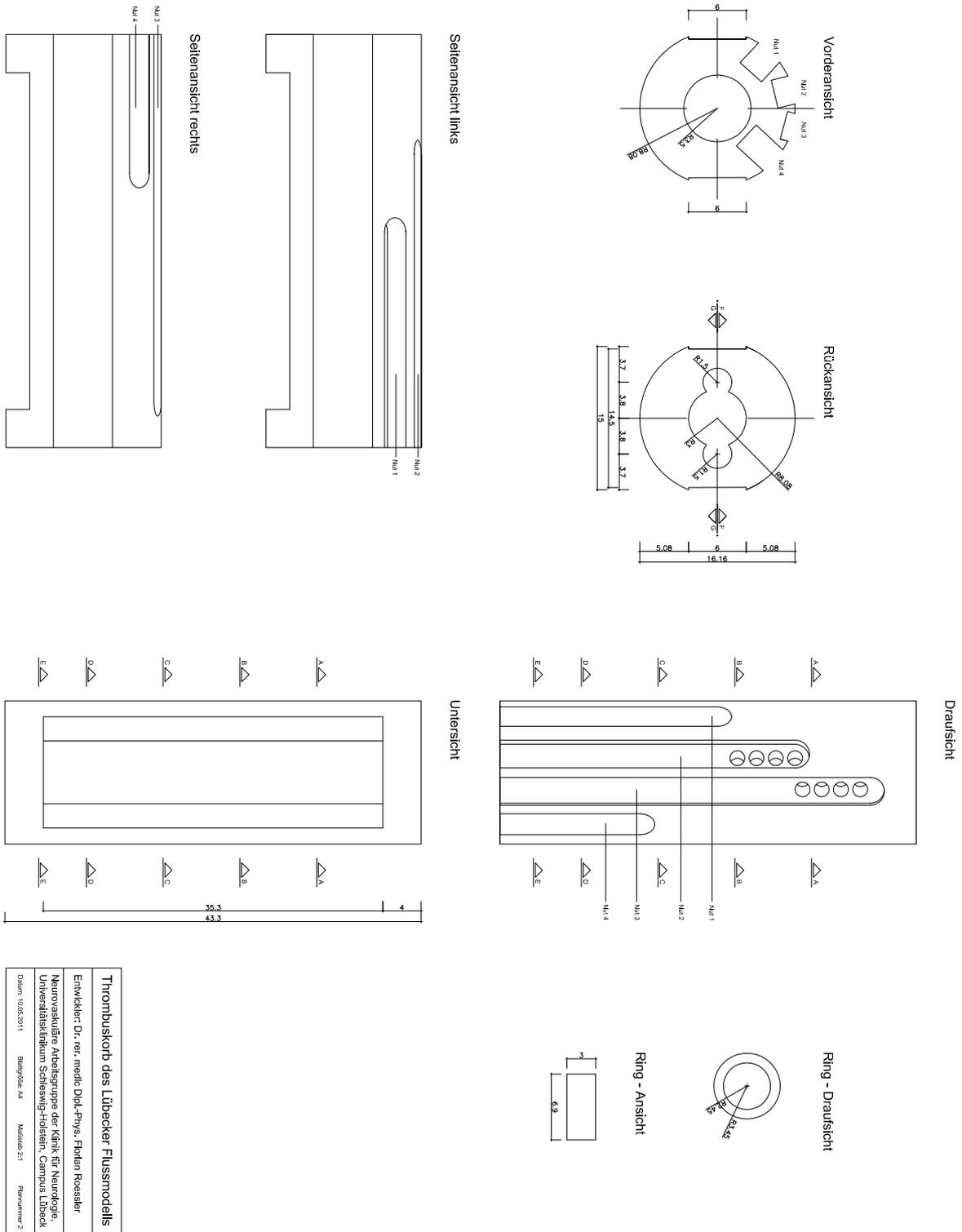
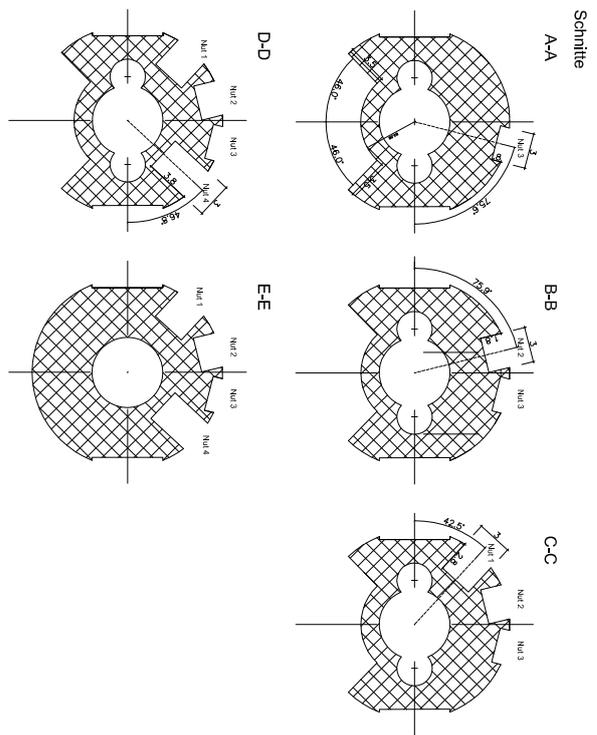
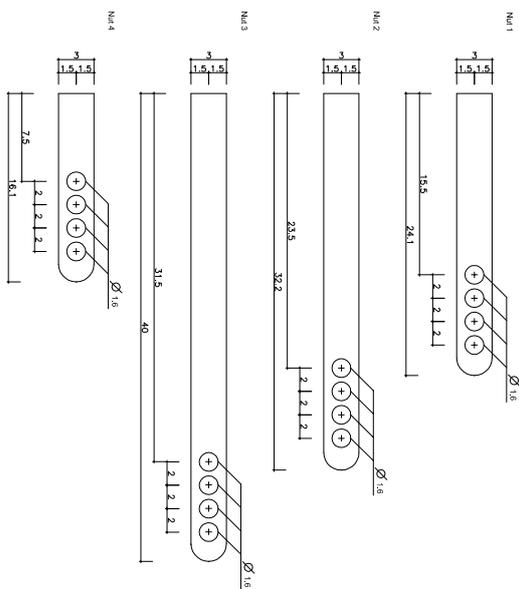
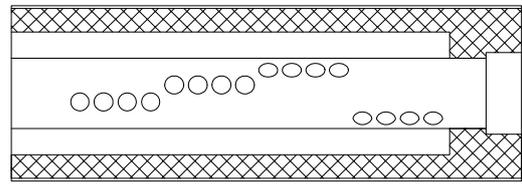
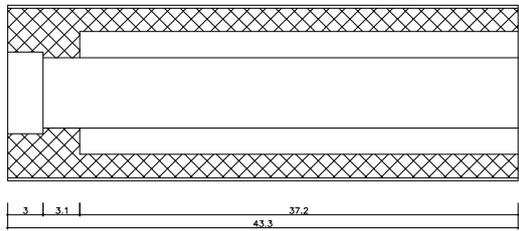


Abb. A.1.: Isometrische Darstellung des Thrombuskorbes. Neben dem Thrombuskorb ist auch der Ring zu sehen, mit dem eine Gazeplatte am distalen Ende des Thrombuskorbes befestigt werden kann. Die Gazeplatte wird dazu über den Ring gelegt, bevor dieser in die Vertiefung des Korbes hineingedrückt wird. Die Gazeplatte verhindert, dass der Thrombus während des Experiments aus dem Korb herausrutscht. Auf den beiden folgenden Seiten sind die technischen Zeichnungen des Korbes abgebildet.



Thrombuskorb des Lübecker Flussmodells
 Entwickler: Dr. rer. medice Dipl.-Phys. Florian Roessler
 Neurovasculäre Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie,
 Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
 Datum: 10.05.2011 Auflage: A4 Maßstab: 2:1 Platinummer: 2

Abb. A.2.: Thrombuskorb - Ansichten.



Thrombuskorb des Lübecker Flussmodells	
Entwickler:	Dr. rer. medic. Dipl.-Phys. Florian Reessler
Neurovasculäre Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck	
Datum:	04.05.2011
Blattgröße:	A4
Kassette:	211
Platznummer:	3

Abb. A.3.: Thrombuskorb - Schnitte und Detailansichten.

B. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Günter Seidel danken. Er brachte mich mit dem Thema der Sonothrombolyse in Berührung und legte damit den Grundstein für diese Arbeit. Meine Forschungstätigkeit wäre ohne seine Unterstützung nicht möglich gewesen. Herrn Prof. Dr. med. Thomas Münte und seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. med. Detlef Kömpf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die klinikübergreifende Unterstützung des Projekts.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Marcus Ohlrich, der mich beim Aufbau des Modells, bei der Durchführung der Experimente und schließlich durch das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit unterstützt hat. Durch seine selbstständige und engagierte Arbeitsweise und die geradezu unerschütterliche Verbreitung einer entspannten und fröhlichen Arbeitsatmosphäre hat er mich enorm entlastet.

Herrn Dipl.-Ing. Peter-Karl Weber und Herrn Dipl.-Ing. Marc Schmieger vom Fraunhofer Institut in St. Ingbert danke ich nicht nur für die Bereitstellung der Pumpe und des Laufzeitdifferenzmessers, sondern auch für ihren freundschaftlichen und professionellen Rat bei technischen Problemen.

Danken möchte ich Herrn Dr. Andreas Sprenger und Herrn PD Dr. med. Peter Trillenberg für Ihre Hilfe bei diversen Programmierungen und die anregenden Diskussionen über statistische oder physikalische Fragestellungen. Für die sachkundige Korrektur der Arbeit bin ich Herrn PD Dr. med. Trillenberg zu weiterem Dank verpflichtet.

Herrn Thomas Piskol gilt mein Dank für die geduldige Unterstützung bei immer wieder auftretenden Soft- und Hardwareproblemen.

Die Entwicklung des Gerinnungsprotokolls wäre ohne die Beratung durch Herrn Dr. med. Jan Henning Marxsen und Herrn Professor Dr. med. Carl-Erik Dempfle nicht möglich gewesen. Dafür, dass die vielen Stunden, in denen wir gemeinsam über Fragen der Gerinnung und der Thrombolyse brüteten nicht nur aus fachlicher Sicht erfolgreich,

sondern auch äußerst angenehm und unterhaltsamen waren, bedanke ich mich herzlich. Das Modell hätte ohne das handwerkliche Geschick, die Gewissenhaftigkeit und Geduld der Mitarbeiter der technischen Werkstatt der Universität Lübeck niemals Gestalt annehmen können. Deshalb möchte ich mich bei dem Leiter der Feinmechanik-Werkstatt Herrn Schulz sowie bei seinen Mitarbeitern Herrn Sahmkow, Herrn Sydow, Herrn Zarembo und Herrn Zelazny bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei dem Glasbläser Herrn Sommer und dem Leiter der Elektronikwerkstatt Herrn Koller für die Hilfe und die vielfältigen Anregungen, die die Entwicklung des Modells vorangetrieben haben.

Frau Dipl.-Ing. Ilka Leckinghaus danke ich für die technische Zeichnung im Anhang und Frau Dipl.-Ku.Wiss. Beatrice Weiskircher für die Korrektur der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Blutspendezentrale Lübeck, vertreten durch Herrn PD Dr. med. Siegfried Görg, danke ich für ihre zuverlässige Kooperation. Allen Blutspender(innen), die bereit waren, unsere Arbeit zu unterstützen, gilt mein ganz besonderer Dank.

Äußerst dankbar bin ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Neuroradiologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Dirk Petersen für die Bereitstellung der interventionell geborgenen Thromben.

Herr Dr. med. Florian Stellmacher führte am Forschungszentrum Borstel die histologischen Untersuchungen der Thromben durch. Dafür bedanke ich mich ganz herzlich.

Bei Herrn Professor Dr. med. Andreas Moser und seinen kompetenten wie fleißigen MTAs Frau Brunk, Frau Reher, Frau Schnackenberg und Frau Wiegers bedanke ich mich für die uneingeschränkte Bereitschaft, mich jederzeit durch ihren professionellen Rat und die Bereitstellung der vorhandenen Ressourcen ihres Labors zu unterstützen. Ohne die Forschungsförderungen der Medizinischen Fakultät des Lübecker UKSH und der Sektion Neurologie der DEGUM hätte diese Arbeit nicht verwirklicht werden können. Das entgegengebrachte Vertrauen erfüllt mich mit Stolz und Dankbarkeit.

Für den liebevollen Rückhalt, den ich im Verlauf meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit stets durch meine Frau Eva Maria und meinen Sohn Levin erfahren durfte, bin ich über alle Maßen dankbar. Die glücklichen Momente, die sie mir durch ihren herzlichen Empfang gerade an solchen Abenden bescherten, an denen ich mal wieder spät und erschöpft, mitunter auch frustriert von der Arbeit nach Hause kam, werde ich nie vergessen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Florian C. Roessler
Anschrift	Percevalstraße 42, 23564 Lübeck
Telefonnummer	0451-9898484 oder 0174-2877799
Email:	florian.roessler@neuro.uni-luebeck.de
Geburtsdatum	9. März 1969
Geburtsort	Hechingen
Familienstand	verheiratet



Beruflicher Werdegang

Seit Sept. 06	Assistenzarzt der Neurologischen Klinik des UKSH, Campus Lübeck bei Herrn Prof. Dr. med. D. Kömpf und Herrn Prof. Dr. med. Th. Münte. Mitglied der Neurovaskulären Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Dr. med. G. Seidel (Forschungsschwerpunkt: Sonothrombolyse).
Juli 04 - Aug. 06	Assistenzarzt auf der Intensivstation und Stroke Unit der Neurologischen Klinik der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg bei Herrn Prof. Dr. med. K. Fassbender.
Juni 03 - Juni 04	Assistenzarzt in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg bei Herrn Prof. Dr. med. W. Reith.

- Sept. 02 - Mai 03 **Assistent** am Institut für Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin bei Herrn Prof. Dr. med. G. Siegel. Forschungstätigkeit auf dem Gebiet sympathischer Erregungsmuster des Hirnstamms und deren Einfluss auf die Gefäßmuskulatur des Menschen. Dozent in der Vorlesung „Integrative Physiologie für Bioinformatik“.
- Okt. 98 - Aug. 99 **Assistent** am Institut für Hochfrequenztechnik der RWTH-Aachen bei Herrn Prof. Dr.-Ing. B. Rembold. Entwicklung eines Computermodells zur Simulation der Gehirndurchblutung zur präoperativen Risikoabschätzung zerebraler Gefäßeingriffe.
- Jan. 97 - Sept. 98 **Wissenschaftliche Hilfskraft** in der Abt. für Neuroradiologie des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der RWTH-Aachen bei Herrn Prof. Dr. med. A. Thron. Forschung auf dem Gebiet der funktionellen Magnetresonanztomographie.

Hochschulbildung

- Mai 08 - Sept. 11 **Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Sonothrombolyse** und Entwicklung des „Lübecker Flussmodells“. Im Rahmen des Förderpreises der Medizinischen Fakultät des UKSH (E05-2008) konnten insgesamt 12 Monate reine Forschungszeit finanziert werden. Die verbleibende Arbeit zur Fertigstellung des Modells und zur Abfassung der Dissertation wurde parallel zur klinischen Tätigkeit geleistet. DEGUM-Wissenschaftspreis der Sektion Neurologie 2008.
- Sept. 05 **Promotion zum Dr. rer. medic.** als Physiker im Fachbereich Humanmedizin an der Charité-Universitätsmedizin Berlin als NaFöG-Stipendiat. Titel der Arbeit: „Entwicklung eines computergestützten Simulationsverfahrens zur präoperativen, nicht-invasiven Risikoabschätzung bei zerebralen Gefäßeingriffen.“
- April 91 - Nov. 02 **Studium der Humanmedizin** an der RWTH-Aachen und der Freien-Universität Berlin. 3. Staatsexamen am 07.11.2002.

April 90 - Feb. 97 **Studium der Physik** an der RWTH-Aachen und Abschluss als Diplom Physiker. Thema der Diplomarbeit: „Verfahren zur Analyse von peripheren Druckpulskurven in Verbindung mit einem Herz-Kreislauf-Modell zur klinischen Diagnoseunterstützung.“

Zivildienst

Aug. 88 - März 90 Pflegedienst auf verschiedenen Stationen des Marien-Krankenhauses in Bergisch Gladbach.

Schulbildung

1980 - 1988 Otto-Hahn-Gymnasium, Bergisch Gladbach.

1975 - 1979 Katholische Grundschule Frankenforst.

Veröffentlichungen über die vorliegende Arbeit

Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Schmieger M, Weber PK, Stellmacher F, Trillenberger P, Eggers J, Seidel G: Introduction of a new model for time-continuous and non-contact investigations of in-vitro thrombolysis under physiological flow conditions. BMC Neurology, 11:58-68, (2011).

Roessler FC, Ohlrich M, Schmieger M, Weber PK, Seidel G: Influence of pressure and flow velocity on thrombolysis in-vitro. Cerebrovascular Diseases, 27(6):116, (2009).

Roessler FC, Ohlrich M, Marxsen JH, Stellmacher F, Seidel G: Standardized clot preparation for investigations of sonothrombolysis. Cerebrovasc Dis., 27(6):21, (2009).

Roessler FC, Wahba S, Ohlrich M, Schmieger M, Weber PK, Seidel G: Computer assisted pulsatile flow-phantom for the investigation of sonothrombolysis. International Journal of Stroke, 3(1):275, (2008).

Roessler FC, Wahba S, Ohlrich M, Schmieger M, Weber PK, Seidel G: Computer assisted pulsatile flow-phantom for the investigation of sonothrombolysis. Cerebrovascular Diseases, 26(1):7, (2008).

Lübeck, den 25. September 2011