

Ehsan Javidi

Dr. med.

Die Etablierung eines experimentellen murinen Hirnblutungsmodells und die Charakterisierung der posthämorrhagischen Leukozyteninfiltration

Fach/Einrichtung: Neurologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Roland Veltkamp

Die Arbeit hatte drei Zielsetzungen. Zur Evaluation therapeutischer Effekte in murinen Hirnblutungsmodellen sollte zunächst ein reproduzierbares Blutinjektionsmodell (bICB) der Maus etabliert werden und gemeinsam mit dem Collagenaseinjektionsmodell (cICB) angewendet werden. Als zweites Ziel sollten bekannte sensomotorische Verhaltenstests in beiden Modellen auf ihre Sensitivität zur langfristigen Detektion funktioneller Defizite untersucht werden. Das dritte Ziel war es den Ursprung infiltrierender Leukozyten im bICB-Modell und die sterile inflammatorische Leukozyteninvasion mit dem Anteil der einzelnen Leukozytensubpopulationen im bICB- und cICB-Modell zu bestimmen.

Insgesamt gelang nach Optimierung der einzelnen Operationsparameter die Etablierung eines sterilen reproduzierbaren Blutinjektionsmodells. Für die folgenden Experimente wurden die Blutungsmengen in beiden Blutungsmodellen mithilfe der Spektralphotometrie angeglichen.

Im Verhaltenstestabschnitt wurden der Corner-, Corner Rotation-, Zylinder- und der Ladder Rung Test auf ihre Eignung zur Erfassung sensomotorischer Defizite in beiden Blutungsmodellen über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht.

Im Corner Test drehten sich die Mäuse in beiden Blutungsmodellen in den ersten 10 Tagen nach cICB und bICB signifikant häufiger zu ihrer ipsilateral zur Blutung liegenden gesunden Seite als in der Kontrollgruppe (Sham-Operation). Im Corner Rotation Test drehten sich die Mäuse nur im cICB Modell in den ersten 10 postoperativen Tagen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe zu ihrer gesunden Seite.

Im Zylinder Test konnte die ursprüngliche Zählung der Wandkontakte keine Unterschiede zwischen den Blutungsgruppen und der Kontrollgruppe aufzeigen. Durch Testmodifikation mit Zählung der initiiierenden Pfoten für die Aufwärts- und Abwärtsbewegung zeigten sich in den

ersten 20 Tagen postoperativ signifikant mehr Kontakte mit der gesunden Pfote in der cICB-Gruppe als in der Kontrollgruppe.

Im Ladder Rung Test konnte in der regulären Anordnung der Sprossen kein konstantes motorisches Defizit in den Gruppen erkannt werden. In der irregulären Anordnung zeigte sich im cICB-Modell eine signifikant erhöhte Fehlerrate der kontralateral zur Blutung gelegenen Vorder- und Hinterpfoten über den Zeitraum von 5 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe und über den gesamten Zeitraum von 30 Tagen zwischen prä- und postoperativen Scores. Insgesamt stellte sich der Ladder Rung Test als sehr zeitintensiv dar und kann für eine praktische Durchführung nur sehr eingeschränkt empfohlen werden.

Im immunologischen Teil der Arbeit wurde zunächst der Ursprung infiltrierender Leukozyten im Blutinjektionsmodell mithilfe reziproker heterologer Blutinjektionen von CD45.2 Wildtyp-Mäusen in CD45.1 Mäuse verifiziert. Es zeigte sich, dass bereits nach einem Tag weniger als 40 % der Leukozyten im Gehirn aus dem injizierten Blut stammten und der Anteil nach fünf Tagen auf weniger als 5 % sank.

Als Zweites wurde die Verteilung und der Zeitverlauf der einzelnen in das Gehirn infiltrierenden Leukozytensubpopulationen in beiden Blutungsmodellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigte sich am 1. und 5. postoperativen Tag in beiden Blutungsmodellen eine signifikant höhere Leukozyteninvasion als in der Kontrollgruppe. Die Gesamtzahl infiltrierender Leukozyten unterschied sich im cICB- und bICB-Modell nicht signifikant an den beiden postoperativen Tagen. Am 5. Tag zeigten sich in beiden Blutungsmodellen die höchsten Leukozytenzahlen. CD4 positive T-Zellen (CD4+) waren an beiden postoperativen Tagen die stärkste Zellpopulation im bICB-Modell gefolgt von den Granulozyten. Im cICB-Modell waren CD4+ T-Zellen und Granulozyten die beiden stärksten Zellpopulationen. Monozyten und NK-Zellen zeigten in beiden ICB-Gruppen eine signifikant höhere Infiltration am 5. postoperativen Tag verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Gruppe der B-Zellen wies keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. CD8+ Zellen stellten die kleinste Population der infiltrierenden Leukozyten in ihrem Verhältnis und ihrer Zahl dar. Das Verhältnis und der zeitliche Verlauf der Leukozyteninvasion war in beiden Blutungsmodellen am 1. und 5. Tag vergleichbar. Im cICB-Modell wanderten jedoch an beiden postoperativen Tagen signifikant mehr Granulozyten ein als im bICB-Modell.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein vergleichbares inflammatorisches Profil des Blutinjektions- und Collagenasemodells und damit eignen sich die Modelle die sterile Inflammation nach experimenteller Hirnblutung im Mausmodell zu studieren. Zur Detektion

von motorischen Defiziten eignete sich der Corner Test in beiden Blutungsmodellen in den ersten 10 Tagen nach der Operation, während der Corner Rotation Test, der modifizierte Zylinder Test und Ladder Rung Test zwar teils über längere Zeiträume, jedoch nur im cICB-Modell ein motorisches Defizit nachweisen konnten.