

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann-Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Steinmetz

**Charakterisierung der Serum-Kinetik des  
sauren glialen Faserproteins (GFAP) bei Patienten mit akutem  
ischämischen Schlaganfall und intrazerebraler Blutung**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Johann Wolfgang Goethe Universität

Frankfurt am Main

Vorgelegt von

Isabel Haberer

aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main im Januar 2010

Dekan : Prof. Dr. J. Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. M. Sitzer  
Koreferent: Prof. Dr. H.-W. Korf

Tag der mündlichen Prüfung: 21.Dezember 2010

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

### **1. Einleitung**

1.1 Der Schlaganfall – Epidemiologie und Pathophysiologie des Hirninfarktes und der intrazerebralen Blutung	5
1.2 Diagnostik und Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls	8
1.3 Diagnostik und Akutbehandlung der intrazerebralen Blutung	12
1.4 Biomarker beim Schlaganfall	16
1.5 GFAP – Lokalisation, Aufbau und physiologische Funktion	19
1.6 GFAP im Serum als diagnostischer Marker des ischämischen Schlaganfalls und der intrazerebralen Blutung	21
1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	23

### **2. Materialien und Methoden**

2.1 Ort und Zeitraum der Untersuchung	24
2.2 Einschlusskriterien	24
2.3 Ausschlusskriterien	25
2.4 Verwendete Geräte und Materialien	26
2.5 Die Erhebung klinischer Daten	27
2.6 Das Schema der Probenentnahme	30
2.7 Die Analyse der GFAP Serumkonzentration	30
2.8 Analysestrategien und statistische Verfahren	32

<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Vorstellungen von zwei beispielhaften klinischen Fällen	34
3.2 Charakterisierungen der Studienpopulation	37
3.3 Analysen der GFAP- Serumkonzentration	40
3.4 Differenzierung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung	43
3.5 Grenzen der Methodik	47
3.6 Korrelation der GFAP Serumkonzentration mit dem Blutungsvolumen bei der intrazerebralen Blutung	47
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Die GFAP Serumkinetik	49
4.2 Die Abhängigkeit der Wertigkeit von GFAP von dessen Bestimmungszeitpunkt	50
4.3 Die Wertigkeit von GFAP in der Diagnostik des akuten Schlaganfalls im Vergleich zu CT und MRT	51
4.4 Einsatzmöglichkeiten der Methode in der Klinik	54
4.5 Einschränkungen der Untersuchung	55
<b>5. Zusammenfassung</b>	56
<b>6. Abstract</b>	58
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	60
<b>8. Danksagung</b>	66
<b>9. Lebenslauf</b>	67

## **1. Einleitung**

### **1.1 Der Schlaganfall – Epidemiologie und Pathophysiologie des Hirninfarktes und der intrazerebralen Blutung**

Der Schlaganfall ist mit 11,4% nach dem Herzinfarkt und den malignen Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache in den Industrieländern (Hamann et al., 1993). Er zählt, laut der Weltgesundheitsorganisation WHO, zu den am häufigsten zur dauerhaften Invalidität führenden Erkrankungen, steht also als Ursache für schwere Behinderungen und Hilfsbedürftigkeit an erster Stelle.

Jährlich erleiden nach aktuellen Schätzungen in Deutschland etwa 200 000 Menschen einen Schlaganfall. Dabei sind vor allem Menschen jenseits des 60. Lebensjahres betroffen (Berger et al., 1998). Der Anteil der über 60-jährigen Einwohner in Deutschland beträgt derzeit rund 24 % der Gesamtbevölkerung. In dieser Altersgruppe ereignen sich nach Angaben des Interdisziplinären Zentrums für Public Health der Universität Erlangen (IZPH) rund 80 % aller Schlaganfälle. Unter dem Begriff Schlaganfall werden der Hirninfarkt, also die zerebrale Ischämie, und die Hirnblutungen zusammengefasst.

Der ischämische Hirninfarkt macht mit 80-85% den größten Anteil aller Schlaganfälle aus.

Er lässt sich in drei Subtypen unterteilen

- Territorialinfarkte sind durch eine Embolie in eine große hirnversorgende Arterie bedingt. Das Infarktareal ist meist größer als 1,5 cm.

Bei den Territorialinfarkten unterscheidet man weiter zwischen kardioembolisch bedingten Infarkten, bei denen der Embolus aus einem Herzvorhof stammt, und atherothrombotischen Infarkten, die durch verschleppte Gerinnsel aus atherosklerotischen Plaques der großen hirnversorgenden Arterien entstehen.

In beiden Fällen ist die ausreichende Perfusion des abhängigen Gefäßterritoriums nicht mehr gewährleistet und es kommt zur Ischämie. Bei Territorialinfarkten ist meist der Kortex mitbeteiligt.

- So genannte lakunäre Infarkte entstehen dagegen durch Verschlüsse von Perforans-Arterien, beispielsweise bei zerebraler Mikroangiopathie. Das Infarktareal ist in der Regel kleiner als 1,5cm, weshalb es bei diesem Infarkttyp auch nur dann zu offensichtlichen neurologischen Ausfällen kommt, wenn wichtige Bereiche des Gehirns, wie beispielsweise die Capsula interna, betroffen sind.
- Eine eher seltene Form des Hirninfarktes ist der hämodynamische Grenzzoneninfarkt. Betroffen sind die Grenzgebiete zweier Endstromarterien, die auch als „letzte Wiesen“ bezeichnet werden. Dieser Typ des ischämischen Schlaganfalls entsteht, wenn der Perfusionsdruck im Gehirn aufgrund hochgradiger Stenosen der zuführenden Gefäße stark absinkt und somit keine ausreichende Durchblutung mehr gewährleistet werden kann.

Ein ischämischer Schlaganfall entsteht, wenn die regionale Hirndurchblutung unter einen Wert von 15ml pro 100g Hirngewebe pro Minute absinkt (Ischämieschwelle). Der normale Blutfluss innerhalb der grauen Substanz beträgt etwa 80ml Blut pro 100g Hirngewebe in der Minute. Die Folge eines ischämischen Schlaganfalls ist somit zunächst eine kritische Verminderung der Gewebsdurchblutung im Gehirn. So kommt es im zentral gelegenen Infarktgebiet zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen.

Der Infarktkern ist die Zone des definitiven Hirninfarktes, die nicht mehr rettbar ist. Dieser Bereich ist von einem Risikogewebe, der sogenannten Penumbra umgeben. In diesem Gewebe ist der Blutfluss reduziert und beträgt etwa 15-25 ml Blut pro 100g Hirngewebe in der Minute. Der Funktionsstoffwechsel ist durch den Hirninfarkt herabgesetzt, der Strukturstoffwechsel hingegen noch erhalten, weshalb dieses Gewebe bei rasch eintretender

Rekanalisation noch als potentiell rettbar gilt. Bleibt die Sauerstoffversorgung in diesem Gebiet jedoch auch weiterhin aus, wird das geschädigte Gewebe in den Infarktkern mit eingeschlossen und geht ebenfalls zugrunde.

Im Gegensatz zu den Hirninfarkten machen die Hirnblutungen etwa 15-20% der Schlaganfälle aus. Die Prognose ist vergleichsweise schlecht: Über ein Drittel der Patienten verstirbt innerhalb eines Monats, über die Hälfte im Verlauf eines Jahres. 37-47% der Patienten, die eine intrazerebrale Blutung überleben, müssen schwerwiegende neurologische Defizite zurückbehalten.

Die Hirnblutungen können in die eigentlichen intrazerebralen Blutungen und die Subarachnoidalblutungen unterteilt werden. Die Subarachnoidalblutung entsteht meist auf dem Boden einer Aneurysmaruptur von Arterien, die zwischen den beiden Hirnhäuten Arachnoidea mater und Pia mater verlaufen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ist vor allem die intrazerebrale Blutung von Bedeutung. Ihr liegt in den meisten Fällen ein jahrelang bestehender arterieller Hypertonus zugrunde.

Es wird zwischen typischen und atypisch gelegenen Blutungen unterschieden.

Die typischen Blutungen betreffen meist die Basalganglien, Thalamus, Kleinhirn oder Pons. Dabei werden Verbindungsbahnen von der Hirnrinde zum Rückenmark beschädigt. Diese typischen Blutungen sind in der Regel durch eine arterielle Hypertonie bedingt.

Im Gegensatz dazu sind atypische Blutungen in den Hirnlappen gelegen (Lobärblutungen). Sie sind neben der Hypertonie oft durch andere Ursachen bedingt. Gefäßmalformationen, eine Amyloidangiopathie oder Tumoren können solche atypisch gelegenen Hirnblutungen auslösen.



## 1.2. Diagnostik und Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls

Die Diagnostik des ischämischen Schlaganfalls stützt sich im Wesentlichen auf zwei Säulen:

- Neurologische Untersuchung. In diesem Rahmen wird anhand der National Institute of Stroke Scale (NIHSS) der Schweregrad der neurologischen Ausfallserscheinungen des Patienten ermittelt. Durch die Abhandlung von 13 Fragen, in denen maximal 42 Punkte erreicht werden können, kann der Untersucher eine erste Einschätzung über die Ausdehnung des ischämischen Schlaganfalls vornehmen. Je höher die Summe der Punkte aus den Fragen 1-13 ist, desto schwerer ist der Infarkt. Unter Anderem werden Bewusstseinsgrad, Motorik, Ausdehnung des Gesichtsfeldes, Sensibilität, Sprache und Neglegt abgefragt.
- Bildgebende Verfahren des Schädels. Im Falle des ischämischen Schlaganfalls kommt dazu in erster Linie die Computertomographie (CT) zum Einsatz. Diese ermöglicht eine schnelle Untersuchung und ist vielerorts verfügbar. Sie hat jedoch im Falle des ischämischen Schlaganfalls den Nachteil, dass das Untersuchungsergebnis innerhalb der ersten drei Stunden meist unauffällig ist. In den letzten Jahren eröffnete auch die MRT eine Reihe völlig neuer Möglichkeiten in der Darstellung intrakranieller Strukturen. Es ist nun möglich, Gefäßstrukturen im Gehirn besser sichtbar zu machen und dreidimensional darzustellen. Neuerdings können mittels funktioneller Methoden (Diffusions-MRI, Perfusions-MRI) auch die regionale Durchblutung, sowie akute Ischämien innerhalb der ersten drei Stunden nach Symptombeginn erfasst werden.

Ein Schlaganfall ist immer ein medizinischer Notfall. In der Akutbehandlung des Schlaganfalls zählt deshalb jede Minute, sodass der Patient so schnell wie möglich in eine Klinik gebracht werden muss. Ein Schlaganfall sollte möglichst in einer Klinik mit angegliederter Schlaganfallstation (Stroke Unit) behandelt werden (Johnston et al., 1999). Die Vitalfunktionen, also Puls, Oxygenierung und Blutdruck, sowie der neurologische Status des Schlaganfallpatienten sollten immer überwacht werden. Zur Aufrechterhaltung des zerebralen Perfusionsdrucks sollte der arterielle Blutdruck leicht erhöht sein. Innerhalb eines Limits von 220mmHg systolisch und 120mmHg diastolisch wird keine Blutdrucksenkung empfohlen (Collins et al., 1994). Ist eine Senkung des Blutdruckes notwendig, sollte diese vorsichtig mit Nitrendipin s.l. oder Urapidil i.v. durchgeführt werden.

Die Akuttherapie des Schlaganfalls basiert zunächst auf dem so genannten „Penumbra“-Konzept (Astrup et al., 1981). Dieses Konzept stützt sich auf die Theorie, dass sich in den ersten Stunden nach Symptombeginn die Zone des irreversiblen Infarktes auf Kosten der Penumbra weiter ausbreitet. Die Größe der Penumbra und wie lange sie bestehen bleibt kann individuell sehr unterschiedlich sein und hängt unter anderem von der Gefäßkollateralisation ab. Somit liegt der Ansatzpunkt für die akute Schlaganfalltherapie in der Erhaltung der Penumbra. Dies ist nur dann möglich, wenn das verschlossene Gefäß rasch rekanalisiert werden kann.

Eine Rekanalisation erfolgt in der Regel durch eine Lysetherapie.

Die Lysetherapie zur Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes darf bei einem ischämischen Schlaganfall nur dann eingeleitet werden, wenn eine intrazerebrale Blutung mittels CT sicher ausgeschlossen werden konnte und ist derzeit nur für ein 3-Stunden-Zeitfenster ab dem Einsetzen der ersten Symptome zugelassen.

Eine Reihe von Studien zur Wirksamkeit der systemischen Lysetherapie mit fibrinolytischen Enzymen, wie Streptokinase oder Urokinase, erbrachte jedoch eher enttäuschende Ergebnisse, da die Blutungsrate und die damit verbundene Frühmortalität nach Verabreichung einer Lyse

sehr hoch war (Donnan et al., 1996). Eine intravenöse Therapie mit Rekombinatem Tissue Plasminogen Aktivator (rtPA) hingegen zeigt wesentlich mehr Erfolge und ist der derzeitige Hoffnungsträger in der Therapie des zerebralen Ischämie (Wardlaw et al., 2004).

Die intravenöse Lyse mit dem Gewebsplasminogenaktivator (rtPA) ist für bestimmte Patienten innerhalb eines Zeitfensters von 3 Stunden eine effektive Behandlung des Schlaganfalls. RtPa ist eine gentechnisch hergestellte Substanz, die in der Lage ist, Plasminogen im Körper zu aktivieren und so Fibringerinnsel in den Gefäßen aufzulösen. Seit 1990 wurden mehrere Studien publiziert, die rtPA als Thrombolytikum verwendeten. In der NINDS-Studie (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) wurden 624 Patienten randomisiert, die innerhalb von 3 Stunden nach dem Einsetzen der ersten Symptome entweder Placebo oder 0,9mg/kg KG rtPA intravenös verabreicht bekamen. In einem Zeitfenster von drei Stunden ließ sich bei 50% der behandelten Patienten die zerebrale Perfusion wiederherstellen (NINDS). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Lysetherapie, trotz eines damit verbundenen Blutungsrisikos von 3% (Riggs et al., 2007), die Mortalität um etwa 13% gesenkt werden kann, sofern sie innerhalb der ersten drei Stunden nach Symptombeginn erfolgt (Hacke et al., 1995). Sie führt zu einem signifikant besseren Behandlungsergebnis mit einer mehr als 30% höheren Wahrscheinlichkeit für die Patienten, in der Folge des Schlaganfalls kein, oder nur ein minimales neurologisches Defizit zurückzubehalten (NINDS). Metaanalysen haben gezeigt, dass die systemische Thrombolyse mit rtPA auch in der klinischen Routine mit vergleichbarer Sicherheit und vergleichbarem Erfolg wie in den klinischen Studien angewandt werden kann (Graham et al., 2003).

Das Ziel der Lysetherapie ist somit eine frühzeitige Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes, wodurch das minder durchblutete aber noch nicht irreversibel geschädigte Gewebe der Penumbra vor dem definitiven Gewebsuntergang bewahrt werden soll.

RtPA ist seit 2000 in Deutschland in dieser Indikation zugelassen, darf jedoch nur in ausgewiesenen Stroke-Units innerhalb des 3 Stunden Zeitfensters zum Einsatz kommen

(Hardemark et al., 1988). Etwa 70% aller Schlaganfallpatienten erreichen die Klinik jedoch nicht mehr innerhalb des drei Stunden Zeitfensters und kommen somit nicht mehr für eine Lysetherapie in Frage (Heuschmann et al., 2003). Zudem sind Schlaganfallpatienten, die jünger als 18 Jahre, beziehungsweise älter als 80 Jahre, sind, ebenfalls von einer Behandlung mit rt-PA ausgeschlossen (Thomalla et al., 2007) Aufgrund dieser Einschlusskriterien kann zurzeit nur ein geringer Teil der Schlaganfallpatienten mit einer rt-PA-Thrombolyse behandelt werden. So liegt die Thrombolyserate in Deutschland derzeit zwischen 1,6-2,7% in kommunalen Krankenhäusern (Reed et al., 2001) und 4,1-8,9% in akademischen Krankenhäusern und Schlaganfallzentren (Weimar et al., 2009).

Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt, die Prähospitalphase des akuten Schlaganfalls so kurz wie möglich zu halten, da jede Verzögerung eine Einschränkung der Effektivität der Lysetherapie bedeuten könnte (Harraf et al., 2002).

Nach den Leitlinien der AWMF sind weitere Kontraindikationen für eine Lysetherapie

- eine Thrombozytenzahl von unter 100 000 beziehungsweise eine Prothrombinzeit von über 15 Sekunden
- ein chirurgischer Eingriff innerhalb der letzten 14 Tage
- ein Hirntrauma im Verlauf der letzten drei Monate
- Ein systolischer Blutdruck von über 185 mm Hg oder ein diastolischer Blutdruck von über 120 mm Hg
- Ein Blutzuckerspiegel von unter 50mg/dl oder über 400mg/dl
- Gastrointestinale Blutungen innerhalb der letzten 21 Tage

Das Ziel der Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls ist somit in der Prähospitalphase zunächst die Stabilisierung der Vitalfunktionen des Patienten. Nach dem Eintreffen in der Klinik stehen in der Behandlung des akuten Hirninfarktes vor allem die

Wiedereröffnung von verschlossenen Gefäßen, das Verhindern von weiteren Hirninfarkten sowie die Abwendung oder Verringerung sekundärer neurologischer Defizite im Vordergrund. In den letzten Jahren sind zahlreiche Studien publiziert worden, die Hinweise darauf geben, dass eine intravenöse Lysetherapie auch jenseits des 3-Stunden-Zeitfensters bei akut aufgetretener zerebraler Ischämie noch effektiv durchgeführt werden kann. Zukünftige Therapiestudien müssen deshalb vor allem der Frage nachgehen, ob sich das Zeitfenster von 3 Stunden für eine wirksame systemische Lysetherapie weiter ausdehnen lässt.

### **1.3 Diagnostik und Akutbehandlung der intrazerebralen Blutung**

Eine Unterscheidung zwischen einer intrazerebralen Blutung und einem ischämischen Schlaganfall gelingt allein durch die klinisch-neurologische Untersuchung nur in Ausnahmefällen, da die Patienten meist durch ähnliche Symptome auffallen.

Aus diesem Grund sind bildgebende Untersuchungen für die Differenzierung zwischen intrazerebraler Blutung und ischämischem Schlaganfall unverzichtbar geworden.

Sowohl im CT als auch im MRT können intrazerebrale Blutungen meist zuverlässig erkannt werden.

Die Ziele der Akutbehandlung in der Klinik sind zunächst vor allem eine Fortführung der präklinischen Basisversorgung (Hennes et al., 1999). Diese konzentriert sich im Wesentlichen auf die Gewährleistung einer suffizienten Sauerstoffversorgung, einer Puls- und Blutdruckkontrolle sowie der Regulation eines entgleisten Blutzuckerspiegels (Steiner et al., 2006). Außerdem sollte ein stabiler intrakranieller Druck unter 20mmHg und ein zerebraler Perfusionsdruck von 70mmHg angestrebt werden (Sammler et al., 2006). Ob die Senkung eines zu hohen Blutdruckes im Falle einer intrazerebralen Blutung sinnvoll ist, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Zwar kann bei 46-56% der Patienten mit intrazerebraler Blutung

eine arterielle Hypertonie nachgewiesen werden, es ist allerdings nicht erwiesen, ob diese auch zu einer schnelleren Größenzunahme des Hämatoms und zu einer erhöhten Mortalität führt (Jüttler et al., 2007). Es ist bisher zudem noch nicht eindeutig geklärt, ob sich das kritische, potentiell rettbar Hirngewebe in der Umgebung des Hämatoms durch eine Senkung des Blutdruckes zu einer hypoperfundierten Ischämiezone entwickeln könnte.

Die Empfehlungen der American Heart Association in Zusammenarbeit mit der American Stroke Association richten sich in diesem Zusammenhang nach dem intrakraniellen Druck und unterscheiden zwischen Patienten, die einen erhöhten intrakraniellen Druck vorweisen und solchen, bei denen der intrakranielle Druck im Normbereich liegt. (Broderick et al., 2007). Ihre Empfehlung lautet, den Blutdruck aggressiv zu senken, wenn er einen systolischen Wert von 200mmHg oder einen mittleren arteriellen Druck von 150mmHg übersteigt. Bei Patienten, deren systolischer Blutdruck einen Wert von 180mmHg nicht übersteigt oder der mittlere arterielle Druck unter 130mmHg liegt und bei denen keine Anzeichen eines erhöhten intrakraniellen Druckes vorliegen, sollte der Blutdruck nur moderat auf Werte um 160/100mmHg gesenkt werden (Broderick et al., 2007).

Die European Stroke Initiative hat zu dieser Problematik andere Richtlinien entwickelt. Sie stellt in der Problematik der Senkung eines erhöhten Blutdruckes im Falle einer intrazerebralen Blutung zunächst die Frage, ob bei dem Patienten ein arterieller Hypertonus vorbeschrieben war. Ist dies der Fall, sollten systolische Blutdruckwerte über 180mmHg oder diastolische Blutdruckwerte über 105mmHg auf einen Zielwert von 160-170/100mmHg oder einen mittleren arteriellen Druck von 120-125mmHg gesenkt werden. Bei Patienten ohne vorbeschriebene arterielle Hypertonie sollten erhöhte Blutdruckwerte auf 150/90mmHg beziehungsweise einen

mittleren arteriellen Druck von 110mmHg gesenkt werden. In jedem Fall wird jedoch empfohlen, den mittleren arteriellen Druck nicht um mehr als 20% zu senken (Steiner et al., 2006). Die European Stroke Initiative empfiehlt außerdem, den arteriellen Blutdruck dem intrakraniellen Druck anzupassen, um in jedem Fall einen intrakraniellen Druck von 60-70mmHg zu gewährleisten.

Die Therapie einer intrazerebralen Blutung kann sowohl konservativ, als auch chirurgisch erfolgen. Empfehlungen für eine chirurgische Therapie werden jedoch nur sehr zurückhaltend gegeben, da dieser Behandlungsmöglichkeit eine genaue Differenzierung der Blutungsform vorausgehen muss (Sammler et al., 2006).

Die 2005 veröffentlichte STICH-Studie (Surgical Trial in Intracerebral Hemorrhage) haben Patienten mit spontanen Hirnblutungen von einer frühen Operation keinen größeren Nutzen als von einer konservativen Therapie. Diese randomisierte kontrollierte multicenter Studie untersuchte 1033 Patienten aus 83 Zentren in 27 Staaten und verglich das Outcome von Patienten, die aufgrund einer intrazerebralen Blutung neurochirurgisch behandelt wurden mit Patienten, die eine konservative Therapie erhielten. Dabei ließ sich kein Benefit für die Durchführung einer Operation erkennen.

Beim Vorliegen einer supratentoriellen Blutung werden die Vorteile einer chirurgischen Sanierung des Hämatoms im Vergleich zur konventionellen Behandlung kontrovers diskutiert. Nach der STICH-Trial haben Patienten durch eine operative Intervention jedoch auch beim Vorliegen einer supratentoriellen Blutungen keinen signifikanten Vorteil (Mendelow et al., 2005).

Im Falle einer infratentoriellen Blutung im Bereich der hinteren Schädelgrube wird die Indikation für eine chirurgische Intervention hingegen meist großzügiger gestellt, da hier die Gefahr für die Entstehung eines Hydrozephalus wesentlich größer ist. Kompressionen des

Hirnstammes sowie eine rasche Verschlechterung des Patienten stellen ebenfalls eine OP-Indikation dar.

Beim Vorliegen intraventrikulärer Blutungsanteile ist die Anlage einer externen Ventrikeldrainage Therapie der Wahl.

Es wird außerdem empfohlen, die INR von Patienten, die unter einer Therapie mit oralen Antikoagulanzen stehen, möglichst zu normalisieren um die Gefahr früher Nachblutungen zu verringern (Steiner et al., 2006). Zum Aufheben der Gerinnungshemmung wird meist Prothrombin-Komplex (PCC), einem Konzentrat aus den Vitamin-K abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X der Vorzug vor der Verabreichung von Fresh Frozen Plasma (FFP) gegeben. Zusätzlich sollte noch Vitamin K verabreicht werden.

Um das Risiko tiefer Venenthrombosen durch die Immobilisation zu verringern, empfehlen jedoch sowohl die American Stroke Association und die American Heart Association als auch die European Stroke Initiative die Gabe von unfraktioniertem Heparin oder niedermolekularem Heparin ab dem zweiten Tag nach dem Auftreten der ersten Symptome (Jüttler et al., 2007).

Seit einer 2005 veröffentlichten Studie (Novo-VII-Studie) stellt die Gabe von aktiviertem rekombinanten Faktor VII (rFVIIa) eine viel versprechende Behandlungsoption dar und eröffnet für die Zukunft neue Perspektiven in der Therapie intrazerebraler Blutungen (Sammler et al., 2006). In diese Studie wurden 399 Patienten eingeschlossen, die entweder ein Placebo (n=96) erhielten, oder mit rekombinanten Faktor VIIa behandelt wurden. 108 der Patienten, die das Verum erhielten, wurden mit 40µg rFVIIa/kg Körpergewicht behandelt, 92 Patienten erhielten 80µg/kg Körpergewicht und 103 Patienten wurden mit 160µg rFVIIa/kg Körpergewicht behandelt. Die Ergebnisse wiesen eine geringere Zunahme des Blutungsvolumens innerhalb der ersten drei Stunden nach Symptombeginn für alle drei Verumgruppen nach. Die Mortalität nach 90 Tagen betrug für die Placebogruppe 29%, in den Verumgruppen sank die Mortalität auf 18% ab. Dieser Ansatz einer hämostatischen Therapie



soll durch eine Gabe von Faktor VIIa sowohl eine Größenzunahme des Hämatoms innerhalb der ersten vier Stunden nach Symptombeginn verringern und somit auch das Outcome und die Prognose der Patienten mit intrazerebraler Blutung verbessern (Mayer et al., 2005).

#### **1.4 Biomarker beim Schlaganfall**

Seit Jahrzehnten wird versucht, spezifische Proteine oder Peptide zu identifizieren, die als Marker in der Diagnostik zerebrovaskulärer Erkrankungen Verwendung finden könnten und eine quantitative Aussage über das Ausmaß einer Hirnschädigung erlauben (Dvorak et al., 2008).

Solche Biomarker konnten in der Neurologie bereits in einer Vielzahl verschiedener Bereiche in wissenschaftlichen Studien zum Einsatz kommen. Beispiele hierfür sind die Subarachnoidalblutung (Vos et al., 2006), Schädel-Hirn-Traumen (Raabe et al., 2000) oder Infektionen des zentralen Nervensystems (Unden et al., 2004).

Einige Forschungsgruppen konnten bereits viel versprechende Daten zum Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen von Biomarkern und beispielsweise der Größe von Infarkt volumina oder klinischen Skalierungssystemen liefern (Aurell et al., 1991).

Auch in der Diagnostik des akuten Schlaganfalls könnten sich Biomarker als sehr hilfreich erweisen. Hierbei steht neben der Diagnose und der Differenzierung akuter Schlaganfallsymptome auch die individuelle Abschätzung der Prognose in verschiedenen klinischen Situationen im Vordergrund. Da man zurzeit in der Diagnose des Schlaganfalls fast ausschließlich auf bildgebende Verfahren angewiesen ist, ist es kaum möglich, eine Akuttherapie schon in der prähospitalen Phase einzuleiten. Ein früher Beginn der Behandlung könnte jedoch zu wesentlich besseren Ergebnissen führen und das Ausmaß der neurologischen Folgeschäden verringern (Dvorak et al., 2008).

Bislang sind in internationalen Studien mehr als 200 Publikationen erschienen, die mehr als 50 Faktoren im peripheren Blut bezüglich ihrer Bedeutung als Biomarker beim akuten Schlaganfall untersucht haben (Förch et al., 2006).

Besonders häufig wurden im Zusammenhang mit Hirninfarkten bisher das S-100B Protein, die Neuronenspezifische Enolase (NSE), das basische Myeloprotein (MBP), das D-Dimer, das Brain Natriuretic Paptide (BNP) und das saure gliale Faserprotein (GFAP) untersucht.

S-100B ist ein Kalzium bindendes Protein, das in hoher Konzentration im Zytosol von Gliazellen vorkommt. Erhöhte S-100B Serumkonzentrationen wurden beim akuten Schlaganfall gefunden (Förch et al., 2006). Der Höchstwert bei wiederholten Messungen korreliert mit der Infarktgröße und dem neurologischen Langzeitergebnis (Missler et al., 1997).

Die Neuronenspezifische Enolase ist ein Enzym des Glukosestoffwechsels, das in verschiedenen Isoformen in Nervenzellen vorkommt. Erhöhte Serumwerte konnten bei zerebralen Traumata, Gehirntumoren, Meningitis und intrazerebralen Blutungen nachgewiesen werden. Der obere Grenzwert im Serum von Erwachsenen beträgt 12,5 µg/l.

Das basische Myeloprotein (MBP) ist ein Bestandteil der Myelinscheiden, die die Axone der Nervenzellen umgeben. Ein Nachweis von MBP im Liquor cerebrospinalis von mehr als 9ng/ml lässt auf eine Schädigung der Myelinscheiden schließen. Diese kann durch die Erkrankung an Multipler Sklerose, durch Schädel-Hirn-Traumen sowie durch Schlaganfälle verursacht sein (Warren et al., 2006).

D-Dimere sind Spaltprodukte von quer vernetztem Fibrin, die bei der Fibrinolyse freigesetzt werden. Erhöhte D-Dimer-Werte wurden nach zerebralen Ischämien und Subarachnoidalblutungen beschrieben und mit einer Verschlechterung der neurologischen Defizite in Zusammenhang gebracht (Barber et al., 2004).

Das Brain Natriuretic Peptide (BNP) ist ein Neurohormon, mit potenten natriuretischen und vasodilatatorischen Effekten. Erhöhte BNP-Spiegel wurden bei Patienten mit ischämischen

neurologischen Defiziten aufgrund eines Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung beschrieben (McGirt et al., 2004).

Das saure gliale Faserprotein (GFAP) ist ein in Gliazellen vorkommendes Strukturprotein, das ein viel versprechender Marker in der Schlaganfalldiagnostik zu sein scheint. Die Wertigkeit dieses Proteins zur Differenzierung zwischen intrazerebraler Blutung und ischämischem Schlaganfall soll in der vorliegenden Arbeit genauer behandelt werden.

Diese Biomarker scheinen für eine Schädigung intrazerebraler Strukturen spezifisch zu sein und sind, wie es scheint, nach Zelluntergang und Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke im Blut nachweisbar (Marchi et al., 2004).

Aus der Vielzahl unterschiedlichen Studien bezüglich dieser Serum-Biomarker lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch kein einheitliches Bild zur Verwendung im klinischen Alltag ableiten.

### **1.5 GFAP – Lokalisation, Aufbau und physiologische Funktion**

Das saure gliale Faserprotein (GFAP) ist ein monomeres Molekül und besteht aus einer Polypeptidkette, die 432 Aminosäuren enthält. Es ist intrazellulärer Bestandteil der sogenannten Gliazellen, die einen wesentlichen Anteil an der Hirnsubstanz ausmachen.

Der deutsche Pathologe Rudolf Virchow benutzte 1846 erstmalig den Begriff Glia und bezeichnete damit Zellen, die sich zwischen Neuronen befinden. Sie grenzen sich strukturell und funktionell von Nervenzellen ab. Virchow nahm an, dass sie die gleiche Funktion erfüllen, wie Bindegewebe in anderen Organen. Heute weiß man jedoch, dass Neuroglia viel mehr sind, als nur Bindegewebe. Nach der Erstbeschreibung durch Virchow galten sie zunächst als rein passive Elemente des Nervensystems, die nichts mit neuronaler Plastizität zu tun haben. Heute weiß man jedoch, dass Gliazellen bei vielen neuronalen Mechanismen von großer Bedeutung sind.

Astrozyten sind eine spezielle Form der Gliazellen, die nur im zentralen Nervensystem zu finden ist. Sie verfügen über eine Vielzahl von Funktionen, mit denen die Integrität des ZNS aufrechterhalten wird. Astrozyten wird eine zentrale Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Gewebsstruktur des ZNS zugeschrieben. Neben der Bildung von Strukturgewebe sowie von Narbengewebe nach Traumata (Gliose) sind sie wesentlich am Aufbau der Blut-Hirnschranke beteiligt. Im menschlichen Gehirn sind Astrozyten der häufigste Zelltyp mit 80 % der Gesamtanzahl an Zellen (Kettenmann et al., 1995). Klassischerweise wurde den Astrozyten die Rolle als Nährzellen und als Stützzellen zugesprochen, da sie mit ihren Endfüßen an den Blutgefäßen sitzen. Die Astrozyten sind nur durch eine Basallamina vom Endothel der Blutgefäße getrennt, was die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Blut und deren Weiterleitung an benachbarte Nervenzellen erleichtert (del Zoppo et al., 2000). Die derzeitigen Erkenntnisse über die Funktion von GFAP sind vor allem mit Hilfe verschiedener Modelle gewonnen worden, die auf einer funktionellen Ausschaltung dieses Proteins beruhen. Demnach hat GFAP einen wesentlichen Anteil an der Formation eines intakten Zytoskeletts und an der Ausbildung und Stabilisierung von Zellfortsätzen, die wiederum eine zentrale Rolle für die Zell-Zell-Interaktion und die Blut-Hirn-Schranke spielen (Weinstein et al., 1991).

Interessanterweise ist das Verhältnis Astrozyten zu Gesamtzahl aller Zellen des Gehirns, der Gliaindex (Kettenmann et al., 1995), umso größer, je höher entwickelt ein Lebewesen ist. Es kann daher vermutet werden, dass Astrozyten eine Rolle bei der Informationsverarbeitung und -speicherung spielen.

1971 wurde von Eng et al. erstmals das saure gliale Faserprotein (GFAP) als 8-9 nm langes Intermediärfilament in Astrozyten beschrieben. De Armond gibt ein Molekulargewicht von 48kDA bei intaktem, das heißt nicht degradiertem GFAP mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 6,4 an (De Armond et al., 1983).

1972 konnte von Uyeda erstmals gezeigt werden, dass GFAP ausschließlich im Gehirn vorkommt (Uyeda et al., 1972). GFAP fungiert als wesentlicher Bestandteil der Fibrillen des Zytoskelettes der Astrozyten (Conley et al., 1979). Es wird davon ausgegangen, dass es einen wesentlichen Faktor in der Stabilisierung und der Sicherung der Astrozytenform darstellt (Eng et al., 1970). Da GFAP somit für Astrozyten spezifisch zu sein scheint, ist es ein wertvoller Marker für deren Identifikation. Der immunhistochemische Nachweis von GFAP in Gewebeschnitten ist heute eine Routinemethode in der Neuropathologie. GFAP ist also ein gehirn-spezifisches Protein und daher ein sehr interessanter Kandidat für einen Biomarker des Schlaganfalls. Bislang existieren jedoch nur wenige Daten zu den Serum-Konzentrationen von GFAP bei Schlaganfallpatienten.

1985 berichtete Albrechtsen erstmals über Versuche GFAP mittels Sandwichimmunoessay nicht nur im Liquor, sondern auch im Blut zu messen. Dies gelang jedoch aufgrund unklarer Interferenzen nicht (Albrechtsen et al., 1985).

## **1.6 GFAP im Serum als diagnostischer Marker des ischämischen Schlaganfalls und der intrazerebralen Blutung**

In den letzten Jahren konnte in einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten eine Korrelation mit dem Nachweis von GFAP und zahlreichen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen werden. All diese Erkrankungen gehen mit einer reaktiven Gliose einher (Tacconi et al., 1998). Diese Astroglieose ist die Folge einer Zellhypertrophie der überlebenden Astrozyten und geht mit einer Reihe erheblicher struktureller Veränderungen einher. Zu diesen zählt unter Anderem eine Akkumulation von intermediären Filamenten, wie GFAP. Irreversibel geschädigte Astrozyten setzen hingegen nach dem Verlust ihrer strukturellen Integrität intrazelluläre Proteine wie GFAP in den Extrazellularraum frei. Somit können solche Proteine nach einem Untergang von Astrozyten schließlich im Liquor cerebrospinalis oder bei lädierter

Blut-Hirn-Schranke auch in der systemischen Zirkulation nachgewiesen werden. Beispiele für neurologische Erkrankungen, die eine Astrogliose hervorrufen sind das Schädel-Hirn-Trauma, intrakranielle Tumoren oder Schlaganfälle.

Bereits 1975 konnten Mori und seine Mitarbeiter GFAP mittels Radioimmunoassay im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Gliomen bestimmen. (Mori et al., 1998).

1985 konnte Albrechtsen über erste Versuche berichten, GFAP durch Immunosandwichassay nicht nur im Liquor, sondern auch im Blut zu messen (Albrechtsen et al., 1985).

Woertgen konnte 2002 in einem Rattenmodell mit experimentellen Schädel-Hirn-Traumen einen signifikanten Anstieg des Serumspiegels von S-100B und GFAP in der Frühphase nach dem Trauma feststellen. Eine zeitliche Korrelation von GFAP-Serumspiegel und der Schwere des Traumas war allerdings nicht möglich. (Woertgen et al., 2002).

In vorausgegangenen Studien konnte auch bereits ein verzögerter Anstieg des sauren glialen Faserproteins Proteins (GFAP) im Serum von Patienten mit ischämischem Schlaganfall verzeichnet werden. Hermann und seine Mitarbeiter versuchten im Jahr 2000 erstmals, anhand der Serumspiegel von S-100B und GFAP beim akuten Schlaganfall eine Differenzierung zwischen verschiedenen Infarkttypen zu treffen. Bei lakunären Infarkten wurden GFAP-Konzentrationen bis  $0,5\mu\text{g/l}$  gemessen, bei Infarkten im anterioren Stromgebiet bis  $0,7\mu\text{g/l}$  und bei Infarkten, die das komplette anteriore Stromgebiet betreffen, konnten Werte bis  $8,5\mu\text{g/l}$  verzeichnet werden. Maximale Serumkonzentrationen wurden in dieser Studie zwischen dem zweiten und vierten Tag nach Symptombeginn gemessen. Die Höhe der Serumkonzentrationen schien außerdem mit der Größe der Infarktvolumina assoziiert zu sein. (Herrmann et al., 2000). Auch weitere Studien konnten sowohl eine Korrelation des GFAP-Serumspiegels mit dem Infarktvolumen, als auch mit dem Ausmaß des neurologischen Defizits sowie dem funktionellen Outcome des Patienten nach drei Monaten nachweisen (Wunderlich et al., 2006).

Aufgrund der frühen Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, vermuteten wir bei Patienten mit intrazerebraler Blutung hingegen einen wesentlich früheren Anstieg der GFAP-Serumkonzentration im Vergleich zu Ischämie-Patienten (Dvorak et al., 2008). Aufgrund dieser Unterschiede im zeitlichen Verlauf könnte GFAP als Serummarker zur Differenzierung von ischämischen Schlaganfällen und intrazerebralen Blutungen herangezogen werden.

In einer Untersuchung der Neurologischen Klinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität wurden GFAP-Serumspiegel von Ischämie-Patienten und Patienten mit intrazerebraler Blutung innerhalb von sechs Stunden nach Symptombeginn verglichen. In diesem Zeitraum zeigte sich nur bei 5 Prozent der Ischämiepatienten ein messbarer GFAP-Wert. Bei den Patienten mit intrazerebraler Blutung hingegen, war der GFAP-Wert bei 81 Prozent der Betroffenen innerhalb der ersten sechs Stunden im Serum nachweisbar (Foerch et al., 2006).

### **1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit sollen im Folgenden dargestellt werden:

1. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit wird zunächst auf die Serumkinetik von GFAP gerichtet. Der Verlauf der Konzentration von GFAP im Serum von Patienten mit ischämischem Hirninfarkt und intrazerebraler Blutung soll detailliert beschrieben und miteinander verglichen werden. Bei der Beobachtung soll vor allem darauf geachtet werden, wann es erstmals zu einem signifikanten Anstieg kommt und wie hoch die gemessenen GFAP-Konzentrationen (GFAP-Peaks) bei intrazerebralen Blutungen und ischämischen Schlaganfällen liegen.
2. Die Diagnostische Wertigkeit der Untersuchung, das heißt die Spezifität und Sensitivität des GFAP-Tests, sollen bestimmt und auf ihre Aussagekraft hin überprüft werden. Dabei soll auch der Frage nachgegangen werden, wie abhängig das prädiktive Potential des

Serum-GFAP-Wertes von dessen Bestimmungszeitpunkt ist. Dazu muss zunächst geklärt werden, in welchem Zeitraum die für die Untersuchung notwendigen Blutentnahmen erfolgen sollen, um ein aussagekräftiges Ergebnis erzielen zu können.

3. Die Ergebnisse aus all diesen Untersuchungen sollen uns schließlich Aufschluss darüber geben, ob GFAP zukünftig als diagnostischer Marker zur Unterscheidung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen in der klinischen Routine zum Einsatz kommen kann.



## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Ort und Zeitraum der Untersuchung**

Die vorliegende prospektive Studie wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Dezember 2007 in der Klinik für Neurologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

In diesem Zeitraum wurden Patienten, die mit der Diagnose eines akuten Schlaganfalls in der Klinik eintrafen, von der Stroke Unit und den Stationen der neurologischen Klinik zu Blutentnahmen rekrutiert. Die Blutproben wurden nach im Vorfeld festgelegten Schemata entnommen. Aus diesen Blutproben wurden Serumproben gewonnen, welche im Verlauf der Studie auf ihren Gehalt an saurem glialen Faserprotein (GFAP) hin untersucht werden sollten. Diese Messungen wurden dann im Zeitraum von November 2006 bis Dezember 2007 in den Laborräumen der neurologischen Klinik der Johann Goethe-Universität in Frankfurt vorgenommen.

### **2.2 Einschlusskriterien**

Die an der Studie teilnehmenden Patienten wurden anhand der folgenden Kriterien rekrutiert:

- Beim Patienten sind aufgrund eines akuten Schlaganfalls neurologische Defizite aufgetreten.
- Die Aufnahme auf der Stroke Unit erfolgt innerhalb der ersten sechs Stunden nach Symptombeginn, dabei muss der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Symptomatik bekannt sein
- Die intrazerebrale Blutung oder zerebrale Ischämie wird durch zerebrale Bildgebung wie Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) diagnostiziert

Nach Prüfung der oben genannten Kriterien wurden die in Frage kommenden Patienten beziehungsweise deren Angehörige in einem Aufklärungsgespräch über die Zielsetzung der Studie sowie über die notwendigen repetitiven Blutentnahmen informiert. Es wurde darauf hingewiesen, dass die gewonnenen Daten anonym gespeichert werden und keinerlei Rückschlüsse auf die Identität der Patienten zulassen. Nach Erhalt der schriftlichen Einwilligung wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen. Ein Votum der Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe Universität über die Studie liegt vor.

### **2.3 Ausschlusskriterien**

Es wurde davon abgesehen Patienten in die Studie aufzunehmen, wenn mindestens eines der nun aufgeführten Kriterien zutraf:

- Bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall können Einblutungen nachgewiesen werden
- Der Patient weist Schädel- oder Hirntraumata in der Vorgeschichte auf
- Der Patient weist Hirnblutungen, Ischämien oder andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems in der Vorgeschichte auf
- Der Patient hat eine maligne Erkrankung
- Der Patient weist ein Alter von <18 Jahren auf

## 2.4 Verwendete Geräte und Materialien

Die angegebenen Geräte und Materialien wurden im Verlauf der Studie zur Durchführung von Blutentnahmen, zur Lagerung sowie zur Bestimmung der Blutkonzentration und der Auswertung verwendet:

- Blutentnahmeröhrchen : S – Monovette  
Fa. Sarstedt, Nurnbrecht, Deutschland
  
- Intravenöse Verweilkanülen: Venflon  
Fa. Becton Dickinson, Helsingborg,  
Schweden
  
- Zentrifuge: Rotina 35  
Fa. Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen,  
Deutschland
  
- Kernspintomograph: Magnetom Vision  
Fa. Siemens AG, München  
Deutschland
  
- Computertomograph : CT Secura  
Fa. Phillips Medical Systems,  
Niederlande
  
- GFAP Analysekit: ELISA  
BioVendor, Heidelberg, Deutschland



Des Weiteren wurden anhand der Anamnese vaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen erfasst, die möglicherweise den Schlaganfall begünstigt haben könnten. Dazu zählen das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, einer Hypercholesterinämie sowie eines Diabetes mellitus. Für die weitere Dokumentation wurde außerdem bei ischämischen Schlaganfällen unterschieden, ob es sich um ein Ereignis im vorderen Stromgebiet (A. cerebri media und A. cerebri anterior) oder im hinteren Stromgebiet (A. basilaris) handelt. Hierzu wurden die CT- und MRT-Aufnahmen der Patienten herangezogen. Bezüglich der Genese des ischämischen Schlaganfalls hielten wir fest, ob das Ereignis atherothrombotisch, mikroangiopathisch oder kardioembolisch bedingt war. Diese Einteilung wurde nach Abschluss aller Untersuchungen (inklusive EKG, Langzeit-EKG, transthorakale Echokardiographie und Doppler-Sonographie) getroffen.

Die finalen Infarktgrößen wurden anhand der zerebralen Bildgebung (Computertomographie oder Magnetresonanztomographie) wie folgt kategorisiert:

Im vorderen Stromgebiet wurde unterschieden zwischen

- I. Infarkten, die auf weniger als  $\frac{1}{3}$  des Versorgungsgebietes der A. cerebri media begrenzt sind
- II. Infarkten, die  $\frac{1}{3}$  –  $\frac{2}{3}$  des Stromgebietes der A. cerebri media ausmachen
- III. Infarkten, die über  $\frac{2}{3}$  des Media-Stromgebietes hinausgehen beziehungsweise mehrere Stromgebiete betreffen.

Die Größe von Infarktarealen im hinteren Stromgebiet wurde nicht weiter kategorisiert.

Um das Blutvolumen beim hämorrhagischen Schlaganfall zu ermitteln wurden ebenfalls CT oder MRT Aufnahmen zur Beurteilung herangezogen. Dabei wurde zunächst festgehalten, ob es sich um eine Blutung in „loco typico“ oder eine atypisch gelegene Blutung handelt.

Das finale Blutvolumen wurde anhand der Standard -Ellipsoid Methode bestimmt (Broderick et al., 1993).

Hierbei wird das Volumen der Blutung nicht exakt ermittelt, sondern über die Berechnung des Volumens einfacher geometrischer Formen approximiert.

Dabei kann die Formel für die Volumen-Berechnung einer Ellipse angewendet werden:

$$V = 4/3 \pi \times r1 \times r2 \times r3$$

V= Volumen

r1, r2,r3 = Radii der Blutung

Dies entspricht annähernd der Formel  $ABC / 2$  (Kothari et.al.,1996) die schnell und einfach verwendet werden kann:

$$V = \frac{A \times B \times C}{2}$$

V = Volumen

A = größter Durchmesser der Blutung im CT

B = Durchmesser 90° zu A

C = Anzahl der CT – Schichten mit Blutung multipliziert mit der Schicht-Dicke

Dabei dauert die Bestimmung nach Angaben der Autoren durchschnittlich 38 Sekunden, bei guter Korrelation mit planimetrischen Messungen und einer exzellenten Reliabilität.

## **2.6 Das Schema der Probenentnahme**

Für die Studie wurde ein Probeentnahme-Schema entwickelt, das acht Blutentnahmen im Zeitraum von 48 Stunden nach Symptombeginn vorsah. Die erste Probeentnahme sollte eine Stunde nach Auftreten der ersten Symptome erfolgen, die weiteren Proben wurden 2, 3, 4, 6, 12, 24 und 48 nach Symptombeginn entnommen. War ein Patient zu einem Entnahmezeitpunkt nicht verfügbar, weil er beispielsweise noch nicht in der Klinik eingetroffen war, oder gerade Untersuchungen wie CT oder MRT durchgeführt wurden, wurde die Blutentnahme ausgelassen. Aus logistischen Gründen verzichteten wir auf den Einschluss von Patienten, die in Wochenend- oder Nachtdiensten in der Klinik eintrafen. Zu den Entnahmezeitpunkten wurden jeweils 2ml Blut aus einer intravenösen Verweilkanüle oder einem intraarteriell gelegenen Kathetersystem in eine Serummonovette überführt. Die Serumproben wurden 10 Minuten nach der Blutentnahme in die Zentrifuge überführt und für 5 Minuten zentrifugiert. Jeweils ca. 500µl des überstehenden Serums wurden in Eppendorfröhrchen abpipetiert und schließlich bei  $-80^{\circ}$  tiefgefroren. Erst nach Abschluss der Rekrutierungsphase wurden die benötigten Proben aufgetaut und zur Messung der GFAP Serumkonzentration herangezogen.

## **2.7 Die Analyse der GFAP Serumkonzentration**

Die quantitativen Serum GFAP-Werte wurden verblindet unter Verwendung eines „Biotin labelled sandwich enzyme linked immuno assay“ (ELISA) ermittelt.

Die Versuchs- und Laborbedingungen sowie die Quantifizierung der Werte erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers BioVendor, Heidelberg.

Zunächst wurden sowohl die Serum- Proben als auch die Kalibrator Lösungen 1:3 verdünnt, bevor sie analysiert werden konnten.

Von den Verdünnungen wurden dann mit Hilfe von Eppendorf- Pipetten konstant 100µl in doppelter Ausführung in die Wells der beschichteten Platte des ELISA-Kits überführt.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Proben dann mit Biotin beschichteten Antikörpern versetzt und eine weitere Stunde inkubiert.

Zwischen jedem Schritt wurden vier Waschzyklen durchgeführt, bei denen jedes Well mit 400µl der speziellen „Wash-Solution“ des Kits ausgespült wurde.

Schließlich wurde den Proben Streptavidin HRP-Konjugate zugesetzt und nach einer weiteren Stunde Inkubation die Farblösung des Kits beigefügt.

Sie sollten nun 20 Minuten lang bei Raumtemperatur vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, weshalb wir die ELISA-Platte für diese Phase in Aluminiumfolie verpackten. Der Farbumschlag wurde nach 20 Minuten durch Zufügen der Stop-Solution des BioVendor Kits beendet. Die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 450nm im Photometer wurde durch einen ELISA-Plate Reader ermittelt. Anhand der im Kit beigefügten Negativprobe wurde die untere Nachweisgrenze ermittelt. Zu diesem Wert wurden drei Standardabweichungen der Werte aus den Leerproben (Blanks) addiert. Das Detection Limit wurde somit definiert als die gemessene Konzentration in den Negativproben plus drei Standardabweichungen ( $A_{\text{blank}} + 3 \times SD_{\text{blank}}$ ). Dies wurde bei jeder Messung neu bestimmt. Alle Werte unterhalb dieser errechneten Messgrenze wurden als 0µg/l angesehen.

Schematisierter Ablauf der Messung:

- Verdünnung der Seren und der Kalibrator Lösungen mit Calibrator Diluent (Kalibrator Lösung) aus dem Biovendor ELISA-Kit sowie destilliertem Wasser, kurzes Anzentrifugieren der Proben
- Überführung von 100µl Serum und Kalibrator Lösung in Bio-Vendor ELISA Wells



- 2 Stunden Inkubation
- Zusetzen der Wash-Solution, danach die ELISA-Plate ausschütteln und ausklopfen, dieser Waschgang wird viermal wiederholt
- Zusatz von 100µl Biotin beschichteter Antikörpern
- 1 Stunde Inkubation
- Nach der Inkubation erneutes Waschen mit der Wash-Solution, viemaliges Wiederholen des Waschvorgangs
- Zusatz von 100µl Streptavidin HRP Konjugate
- 1 Stunde Inkubation
- erneutes Waschen mit der Wash-Solution in 4 Waschzyklen
- Zusatz von 100µl Substrat-Lösung
- 20min Inkubation bei Vermeidung von direktem Sonnenlicht
- Zusatz von 100µl Stop Lösung in der gleichen Reihenfolge wie beim Zusatz der Substrat Lösung
- Messung im ELISA Plate Reader innerhalb von 5-15 Minuten

## **2.8 Analysestrategien und statistische Verfahren**

Für jeden Patienten computergestützt die ermittelten Werte gegen die verstrichene Zeit nach Symptombeginn aufgetragen. Dann wurden die einzelnen Messzeitpunkte auf ihr Potential hinsichtlich der Differenzierung zwischen ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall überprüft. Die statistische Auswertung wurde mithilfe des SPSS Software Packages (SPSS Inc. Chicago, USA) vorgenommen.

Zum Vergleich der GFAP-Serumkonzentration zwischen Ischämien und Blutungen wurde der „Mann-Whitney-Test“ angewandt. Dies ist ein statistischer Homogenitätstest, mit dem sich

die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also in diesem Fall Ischämie und Blutung, überprüfen lässt. Er ist ein non-parametrischer Test, kommt also zur Anwendung wenn die Werte nicht normalverteilt sind und der T-Test somit nicht angewandt werden kann. Dazu vergleicht man jeden Wert der Proben von Ischämie Patienten mit jedem Wert der Proben von Patienten mit intrazerebraler Blutung, sodass  $n_1 \times n_2$  Vergleiche zustande kommen. Man prüft so den Zusammenhang zwischen beiden Größen.

Anhand der Kurvenanalyse der Receiver operating characteristics (ROC) wurden dann für jeden Zeitpunkt cut-off points festgelegt und die Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung zwischen zerebraler Ischämie und intrazerebraler Blutung optimiert, um diese anhand der Vierfeldertafel abzuleiten.

Der Spearman rho Test wurde verwendet, um den Grad Korrelation zwischen Blutungsvolumen und gemessener GFAP-Konzentration bei intrazerebralen Blutungen zu ermitteln. Dieser Test muss in unserem Fall dem Pearson Test vorgezogen werden, da hier die Werte nicht normalverteilt sind. Der Spearman Test hingegen ist geeignet, um nicht normalverteilte Werte zu korrelieren. Hierzu wird ein Rangkorrelationskoeffizient bestimmt, indem Rangdifferenzen zwischen den einzelnen Werten des Wertepaares, in diesem Fall Blutungsvolumen und gemessenem GFAP-Wert, errechnet werden.

Aus den Ergebnissen der Berechnung der Rangdifferenzen werden die Rangdifferenzquadrate ermittelt und daraus die Summe gebildet. Je höher dann die Summe der Rangdifferenzquadrate ist, desto niedriger ist die Rangkorrelation nach Spearman.

Mithilfe der Bonferroni-Methode konnte beim multiplen Paarvergleich der Alphafehler durch Verwendung der Bonferroni-Ungleichung neutralisiert werden. Dazu wurde das globale alpha-Niveau zu gleichen Teilen auf die Einzeltests verteilt.

Die Anwendung der Statistischen Verfahren wurde mit dem Institut für Biometrie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt abgestimmt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vorstellung von zwei beispielhaften klinischen Fällen

Im Folgenden werden zunächst zwei repräsentative Fälle vorgestellt, von denen ein Patient einen ischämischen Schlaganfall und ein weiterer eine intrazerebrale Blutung erlitt:

Fall 1:

Der zum Aufnahmezeitpunkt 60jährige männliche Patient traf um 9:30 Uhr mit einer linksseitigen brachiofazial betonten Hemiparese in der Klinik für Neurologie der Johann-Wolfgang Goethe Universität ein.

Er hatte am frühen Morgen des gleichen Tages, etwa zwei Stunden vor Aufnahme, erstmals eine Schwäche der linken Körperhälfte bemerkt.

Initial bestand eine hypertensive Entgleisung im Rahmen einer arteriellen Hypertonie.

An weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren war ein Nikotinabusus bekannt.

Der Patient war somnolent, jedoch auf Ansprache prompt erweckbar.

Nach einer ausführlichen neurologischen Untersuchung wurde ihm ein NIHSS Wert von 9 zugewiesen.

In der initialen Computertomographie des Schädels konnte eine rechts putaminal gelegene Blutung nachgewiesen werden. Das Blutungsvolumen betrug 39,9 ml.

Aufgrund der Lokalisation war diese am ehesten auf die arterielle Hypertonie zurückzuführen.

Eine computertomographische Angiographie gab keinen Hinweis auf eine Gefäßmalformation oder eine andere Blutungsursache.

Aufgrund der großen Blutung musste der Patient intubiert werden und entwickelte daraufhin eine Bronchopneumonie, die in das Vollbild einer Sepsis überging. Er verstarb an den Folgen seiner Erkrankung.

Vier Stunden nach Symptombeginn zeigte sich ein Anstieg des GFAP-Wertes auf  $0,1\mu\text{g/l}$ . Im Verlauf stieg die Serumkonzentration von GFAP stetig an und erreichte 24 Stunden nach Symptombeginn ein Maximum bei einem Wert von  $3,05\mu\text{g/l}$ .

Die Kinetik der GFAP-Serumkonzentration im Falle von Patient 1 ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt.

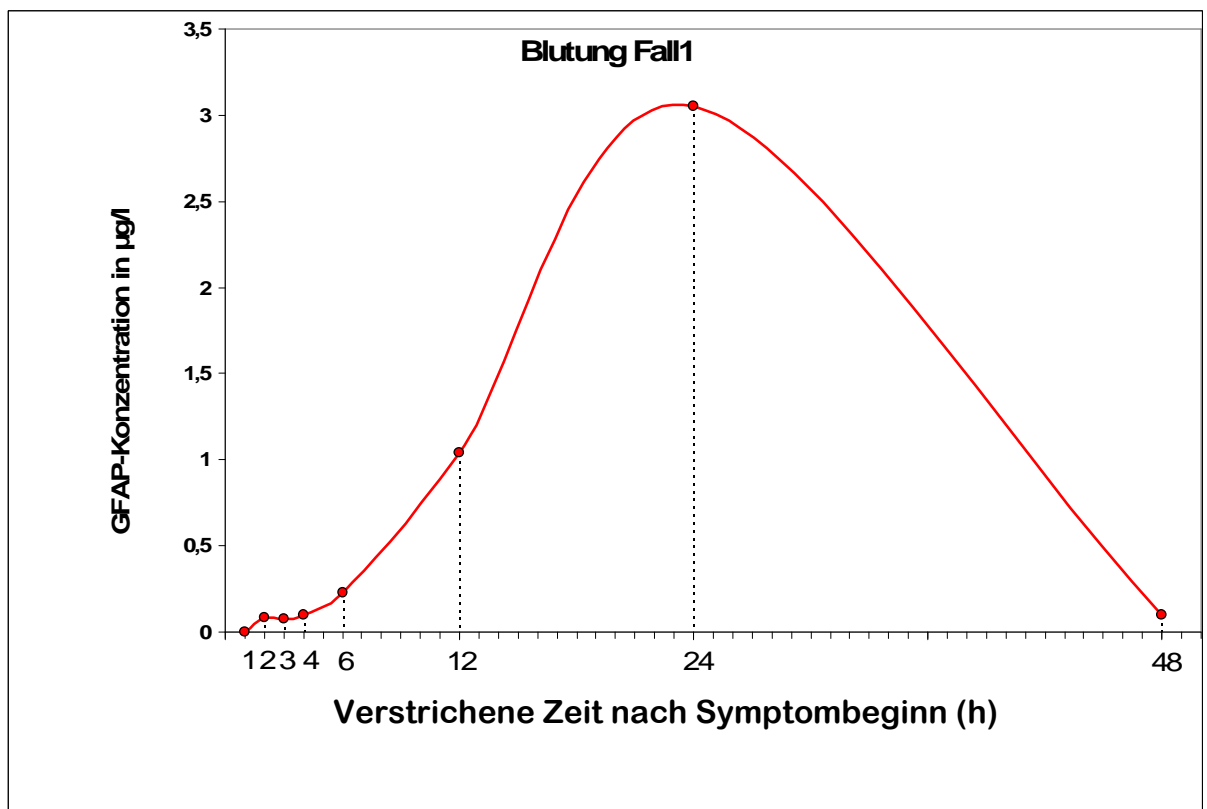


Abbildung 1: Verlauf der GFAP-Serumkonzentration von Patient 1, mit stattgehabter rechts putaminal gelegener Blutung von 39,9ml.

Fall 2:

Der zum Aufnahmezeitpunkt 68 Jahre alte Patient wurde am aufgrund einer akut aufgetretenen Sprechstörung und Hemiplegie der linken Körperhälfte auf die Stroke Unit der Neurologischen Klinik eingewiesen.

Bezüglich der Risikofaktoren für einen Schlaganfall wurde von einer positiven Familienanamnese sowie einem über viele Jahre bestehenden Nikotinkonsum berichtet.

Zum Zeitpunkt der Aufnahme war der Patient wach und orientiert, wies jedoch eine faziale Parese links sowie eine hochgradige linksseitige Hemiparese auf.

Nach der neurologischen Untersuchung konnte dem Patienten ein NIHSS-Wert von 16 zugewiesen werden.

Die initiale kernspintomographische Bildgebung zeigte eine ausgedehnte Diffusionsstörung im Versorgungsgebiet der rechten A. cerebri media.

In der MR-Angiographie konnte außerdem ein Verschluss der rechten A. carotis interna auf dem Boden einer spontanen Dissektion festgestellt werden.

Der Patient erhielt noch im Zeitfenster von 6 Stunden eine gewichtsadaptierte systemische Lysetherapie mit rtPA und Tirofiban sowie begleitend Heparin.

Aufgrund zunehmender Hirnschwellung wurde im Verlauf eine Entlastungskraniektomie durchgeführt.

Die erste Blutentnahme erfolgte in diesem Fall etwa drei Stunden nach dem von der Ehefrau beobachteten Symptombeginn.

Bei der Analyse der GFAP-Serumkinetik zeigte sich im Falle von Patient 2 erst 48 Stunden nach dem Einsetzen der ersten Symptome ein GFAP Anstieg auf  $0,99\mu\text{g/l}$ .

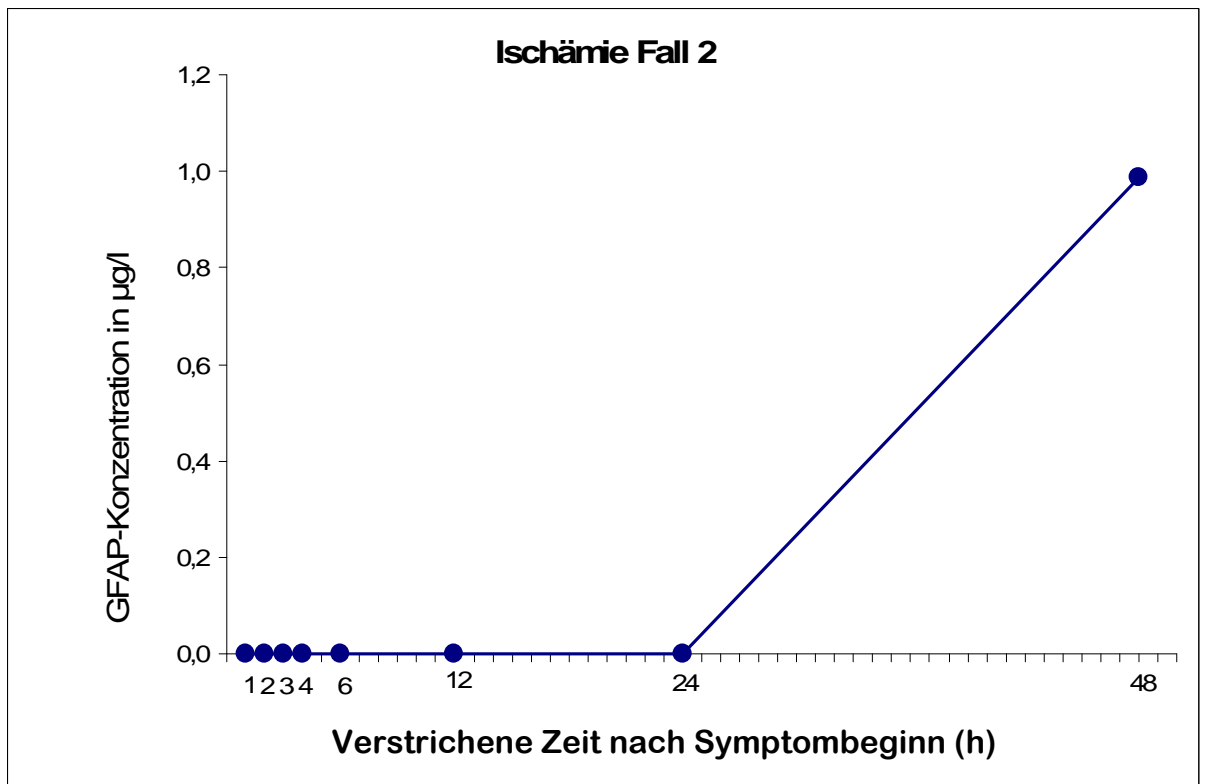


Abbildung 2: Verlauf der GFAP-Serumkonzentration von Patient 2, mit ausgedehntem Mediainfarkt rechts

### 3.2 Charakterisierung der Studienpopulation

Nach den oben beschriebenen beispielhaften Falldarstellungen soll nun die Charakterisierung der eingeschlossenen Patienten hinsichtlich wichtiger klinischer Parameter erfolgen.

Im Zeitraum von Januar 2004 bis September 2005 wurden 63 Patienten im Alter zwischen 60 und 83 Jahren, die mit der Symptomatik eines akuten Schlaganfalls auf der Stroke Unit der neurologischen Klinik der Universität Frankfurt eintrafen, in die vorliegende Studie eingeschlossen. Von den aufgenommenen Patienten litten 45 an einer zerebralen Ischämie und 18 an einer intrazerebralen Blutung. 44,4 Prozent der untersuchten Patienten waren Frauen. Vom Eintreten der ersten Symptome bis zur Vorstellung in der Klinik vergingen im Durchschnitt etwa zwei Stunden. Die NIHSS Werte der untersuchten Patienten lagen

zwischen 8 und 17 Punkten, wobei die sowohl die Patienten mit intrazerebraler Blutung als auch Patienten mit ischämischem Schlaganfall einen NIHSS-Durchschnittswert von 14 aufwiesen.

Bei den Patienten mit zerebraler Ischämie war die Mehrzahl der Schlaganfälle (60%) kardioembolisch bedingt. Bei weiteren 20 Prozent der Ischämiepatienten lag dem Schlaganfall eine Makroangiopathie zugrunde, in den übrigen 20 Prozent der Fälle eines ischämischen Schlaganfalls konnte die Ursache nicht eindeutig geklärt werden. Keiner der untersuchten Patienten hatte eine zerebrale Ischämie aufgrund einer Mikroangiopathie.

Bei der Mehrzahl (78 %) der untersuchten Patienten mit hämorrhagischem Schlaganfall war die Blutung in Loco typico, das heißt im Bereich der Basalganglien lokalisiert. Nur bei 12 Prozent der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit intrazerebraler Blutung lag die Blutungsquelle im Bereich des posterioren Stromgebietes.

Die aufgeführten klinisch relevanten Daten der Patienten wurden in Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1

	<b>Ischämischer Schlaganfall (n=45)</b>	<b>Hämorrhagischer Schlaganfall (n=18)</b>
<b>Patienten Charakteristika</b>		
Alter	75 (61,83)	62 (60,70)
Frauen (n)	20	8
Zeit bis zur Vorstellung (Std)	2 (1,3)	2 (1,2)
NIHSS	14 (8,17)	14 (10, 16)
Thrombolyse (n)	23	----
<b>Ätiologie der Ischämie</b>		
Makroangiopathie	9	
Kardioembolisch	27	
Mikroangiopathie	0	
Unbekannt	9	
<b>Größe des infarzierten Gebietes</b>		
< 1/3 MCA	15	
1/3-2/3 MCA	13	
> 2/3 MCA	13	
Posteriores Stromgebiet	4	
<b>Blutungslokalisierung</b>		
Basalganglien		14
Hirnstamm		0
Lobärblutung		4
<b>Blutungsvolumen</b>		
0-20 ml		9
21-40 ml		4
41-60 ml		2
>60 ml		3

Alter der Patienten: Medianwert, die Angaben in Klammern beziehen sich auf das 25. und 75. Perzentil  
 „Vorstellung (Stunden)“ = Zeitspanne zwischen dem Beginn der ersten Symptome und dem Eintreffen in der Klinik, Zahlen in Klammern geben das 25. und 75. Perzentil an

MCA= A. cerebri media

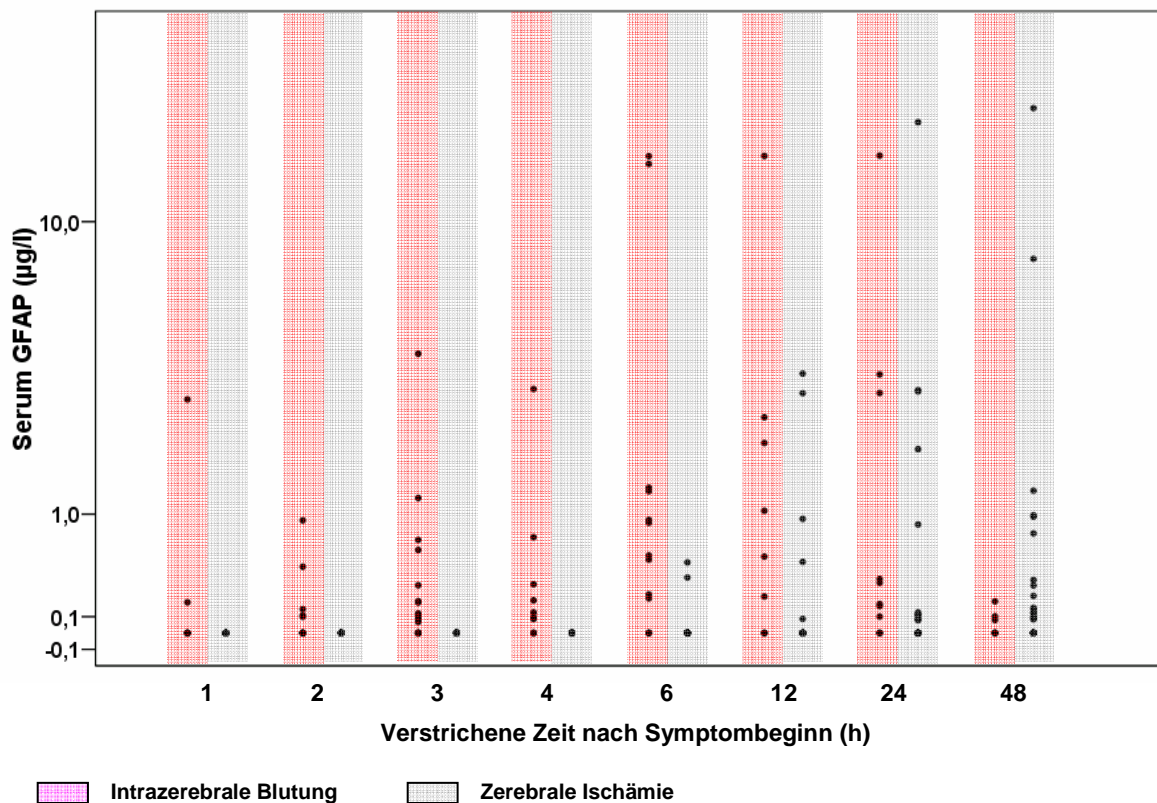
NIHSS = National Institute of Health stroke scale, Angaben in Klammern geben das 25. und 75. Perzentil an



### 3.3 Analyse der GFAP Serumkonzentration

Von allen 261 gemessenen Proben lagen 84 (32%) über dem Detection limit. Die niedrigste gemessene Serumkonzentration von GFAP, die noch oberhalb des Detection limits lag betrug  $0,078 \mu\text{g/l}$ , der höchste gemessene GFAP Wert lag bei  $20,327 \mu\text{g/l}$ .

Die GFAP Serumkonzentrationen aller im Rahmen der vorliegenden Untersuchung analysierten Proben ( $n=261$ ) wurden – getrennt nach Diagnose - in Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit nach Symptombeginn aufgezeichnet. Die ermittelten Werte und ihr zeitlicher Verlauf können der folgenden Abbildung 3 entnommen werden.



Auf der y-Achse (logarithmierte Darstellung) sind Werte für die GFAP-Konzentration in  $\mu\text{g/l}$  aufgetragen. Die Entnahmezeitpunkte auf der x-Achse markieren die Zeitspanne vom Beginn der Symptome bis zur Blutentnahme. Intrazerebrale Blutungen sind auf den violetten Säulen aufgetragen, während zerebrale Ischämien Blau markiert sind.

Im Folgenden sollen nun die Werte von GFAP im Serum der Patienten mit ischämischen Schlaganfällen und intrazerebralen Blutungen statistisch analysiert und verglichen werden.

In Tabelle 2 sind die Median Werte der GFAP-Serumkonzentrationen ( $\mu\text{g/l}$ ) bei Patienten mit intrazerebralen Blutungen und zerebralen Ischämien in Abhängigkeit von den Entnahmezeitpunkten der Blutproben dargestellt.

Tabelle 2

Zeit	Proben	Blutung	Ischämie	p
1	21 (14;7)	0,00 (0,00;0,20)	0,00 (0,00;0,00)	0,040
2	35 (24;11)	0,00 (0,00;0,15)	0,00 (0,00;0,00)	<0,001*
3	39 (22; 17)	0,10 (0,00;0,47)	0,00 (0,00;0,00)	<0,001*
4	26 (16; 10)	0,11 (0,00;0,43)	0,00 (0,00;0,00)	<0,001*
6	53 (39; 14)	0,55 (0,00;1,30)	0,00 (0,00;0,00)	<0,001*
12	30 (21; 9)	0,56 (0,00;2,27)	0,00 (0,00;0,04)	0,026
24	50 (39; 11)	0,18 (0,00;3,05)	0,00 (0,00;0,09)	0,006*
48	39 (32; 7)	0,00 (0,00;0,10)	0,09 (0,00;0,30)	0,331

Zeit= Zeitpunkt der Blutentnahmen nach Symptombeginn (h)

Proben = Anzahl der Proben, die zum jeweiligen Zeitpunkt entnommen werden konnten  
(in Ischämien und Blutungen unterteilt)

Blutung = Median und Quartilsabstände der Serum GFAP Werte beim hämorrhagischen Schlaganfall ( $\mu\text{g/l}$ )

Ischämie = Median und Quartilsabstände der Serum GFAP Werte beim ischämischen Schlaganfall ( $\mu\text{g/l}$ )

P= die P Werte wurden anhand des „Mann-Whitney-Tests“ abgeleitet (Anpassung durch die Bonferroni Methode für multiples Testen  $p=0,0063$ ). Mit Sternchen gekennzeichnete p-Werte weisen eine hohe statistische Signifikanz auf.

Bei Patienten mit intrazerebralen Blutungen betrug der niedrigste GFAP Wert, der noch über der unteren Messgrenze lag,  $0,07\mu\text{g/l}$ , die höchste gemessene Konzentration lag bei  $15,14\mu\text{g/l}$ . Die Kinetik der Serum-GFAP-Konzentration bei Patienten mit intrazerebraler Blutung gestaltete sich wie folgt: Der Median-Wert der gemessenen GFAP Konzentrationen im Serum war bereits nach drei Stunden erhöht.

GFAP- Medianwerte von  $0,55\mu\text{g/l}$  wurden beim Messzeitpunkt von 6 Stunden gemessen (Quartile von  $0,21- 15,12\mu\text{g/l}$ ). Bei der Messung 12 Stunden nach Symptombeginn wurde ein Medianwert von  $0,56\mu\text{g/l}$  erreicht (Quartile  $0,24 - 15,14\mu\text{g/l}$ ). 15 der 18 Patienten mit intrazerebraler Blutung wiesen einen GFAP-Peak auf. Nach 24 Stunden konnte man bei diesen Patienten schon ein erstes Absinken der GFAP-Werte feststellen. 48 Stunden nach dem auftreten der ersten Symptome hatten nur noch drei der 18 Patienten mit intrazerebraler Blutung GFAP-Serumwerte oberhalb des Detection limits.

Im Vergleich zu diesem Verlauf stellte sich die Kinetik der GFAP Werte bei Patienten mit zerebraler Ischämie anders dar: Der niedrigste gemessene Anstieg der GFAP- Serum-Werte lag bei  $0,079\mu\text{g/l}$ . Hier blieben die Medianwerte während der ersten 24 Stunden nach Symptombeginn unterhalb der Messgrenze. Erst nach 48 Stunden machte sich ein Anstieg der medianen GFAP Konzentration bemerkbar, wie sich aus Abbildung 7 entnehmen lässt. Hier lag der Medianwert der Konzentrationen bei  $0,09\mu\text{g/l}$  (Extremwerte  $0,08 - 20,33\mu\text{g/l}$ )

Somit zeigte die Kinetik bei Patienten mit intrazerebraler Blutung sowohl einen wesentlich steileren Verlauf als auch einen rascheren Abfall der GFAP Serumwerte im Vergleich zur zerebralen Ischämie. Die unterschiedlichen Verläufe der GFAP-Serumkinetik bei intrazerebralen Blutungen im Vergleich zu zerebralen Ischämien wurden in Abbildung 4 zusammenfassend gegenübergestellt:

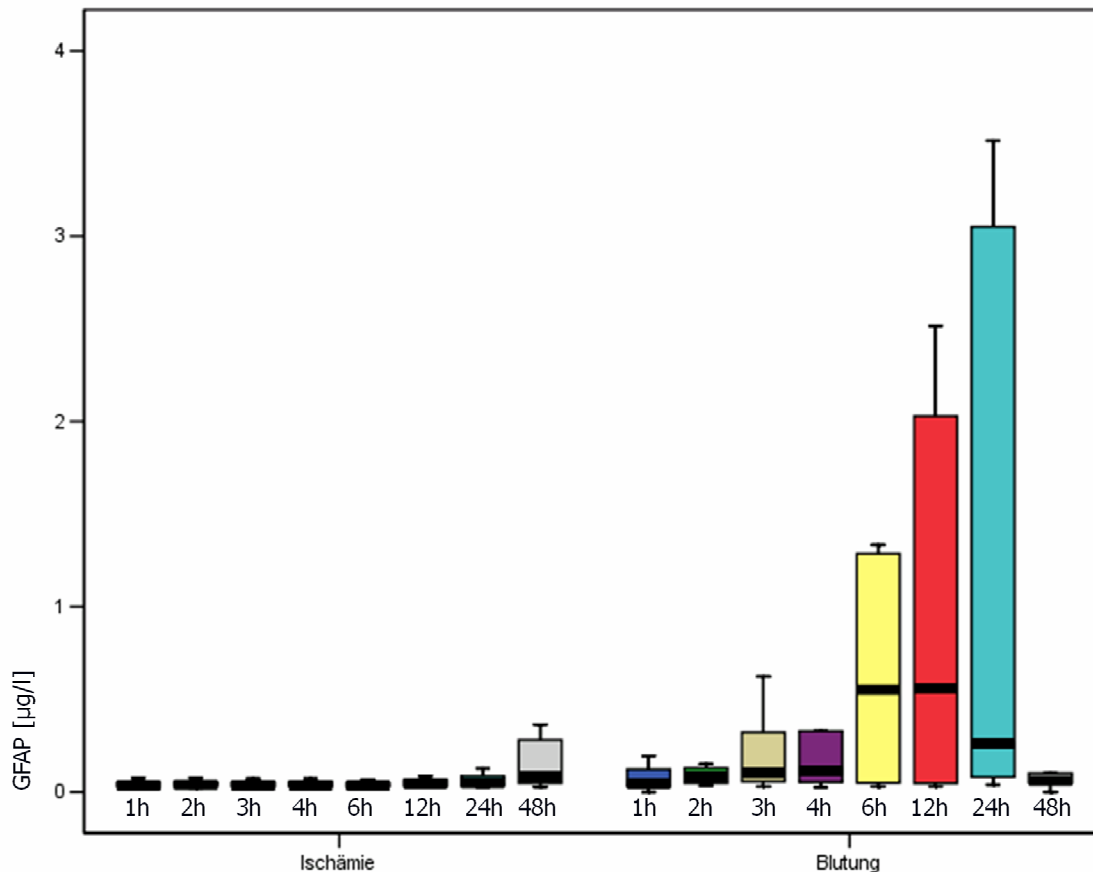


Abbildung 4 vergleicht die GFAP-Serum-Kinetik bei Patienten mit akutem ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall in den ersten 48 Stunden nach Symptombeginn. Die Whiskers nach unter markieren die 10. Perzentilen, farbige Boxen bis zum Balken stellen 25. Perzentilen dar, ab dem schwarzen Balken sind die 50. Perzentilen markiert, darauf folgt die Darstellung der 75. Perzentilen während Whiskers nach oben die 90. Perzentilen darstellen.

### 3.4 Differenzierung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit stellte die Überprüfung von GFAP in seiner Funktion als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung dar. Bei einer Vielzahl von Patienten mit zerebraler Ischämie konnte in der frühen Phase des Schlaganfalls kein Anstieg der GFAP-Serum-Konzentration gemessen werden. Nur zwei der 45 Patienten zeigten bereits sechs Stunden nach Symptombeginn einen GFAP Wert oberhalb des Detection limits. Im Gegensatz dazu wurden

bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung bereits zwei Stunden nach Symptombeginn die ersten GFAP Konzentrationen oberhalb der unteren Messgrenze ermittelt.

Unter Verwendung der einzelnen Messwerte wurde mit Hilfe einer ROC Analyse für jeden der Messzeitpunkte ein Cut-Off- Wert berechnet. Mit Hilfe einer Vierfeldertafel ließen sich dann die diagnostischen Kennzahlen Sensivität, Spezifität und Overall Accuracy ableiten.

Dies ist in Tabelle 3 zusammengefasst:

Zeit	CP	Sens.	Spez.	OA	p
1	0,10	0,14	1,00	0,71	0,147
2	0,05	0,45	1,00	0,83	<0,001*
3	0,03	0,65	1,00	0,85	<0,001*
4	0,04	0,70	1,00	0,88	<0,001*
6	0,11	0,71	0,95	0,89	<0,001*
12	0,16	0,67	0,81	0,77	0,011
24	0,15	0,64	0,87	0,82	<0,001*
48	-	-	-	-	-

Zeit= Blutentnahme Zeitpunkt nach Symptombeginn (h)

CP = Cut off point (abgeleitet von der ROC Kurvenanalyse) in µg/l

Sens.= Sensitivität

Spez.= Spezifität

OA = Overall accuracy = Gesamtgenauigkeit

P= die P Werte wurden anhand der Bonferroni Methode für multiples Testen adjustiert (p=0,0063 [Serum GFAP Messungen]; p=0,0071 [Prädiktiver Wert])

Mit Sternchen gekennzeichnete p-Werte weisen eine hohe statistische Signifikanz auf.

Die Sensitivität der Untersuchung lag während der ersten beiden Stunden nach Symptombeginn unter 0,5 und zeigte den geringsten prädiktiven Wert im Vergleich zu allen Messzeitpunkten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass viele Patienten mit intrazerebraler Blutung in der sehr frühen Phase der Erkrankung noch keinen Anstieg der GFAP Werte zeigten. Somit kann man anhand der Serumkonzentration von GFAP innerhalb der ersten zwei Stunden noch keine sichere Aussage über das Vorliegen einer intrazerebralen Blutung machen.

Zwischen zwei und sechs Stunden nach Symptombeginn waren die GFAP- Werte von Patienten mit intrazerebraler Blutung jedoch bereits signifikant höher als die von Ischämiepatienten ( $p < 0,001$  für alle vier Messzeitpunkte). Hinsichtlich der Identifikation einer intrazerebralen Blutung zeigten die Serumkonzentrationen der Messungen bei 6 und 12 Stunden den höchsten Grad an Prädiktivität. Die Sensitivität des GFAP-Wertes für 6 Stunden nach Symptombeginn hatte einen Wert von 0,71, die Spezifität betrug 0,95. Für den Messzeitpunkt 12 Stunden nach dem Einsetzen der ersten Symptome lag die Sensitivität bei 0,67, die Spezifität betrug 0,81. Somit stieg im zeitlichen Verlauf die Sensitivität des Tests zur Vorhersagbarkeit einer intrazerebralen Blutung an.

Im Vergleich zur Sensitivität wies die Spezifität des Tests innerhalb der ersten sechs Stunden wesentlich bessere Werte auf. Im Zeitfenster von 6 Stunden nach dem auftreten der ersten Symptome war die Spezifität durchgehend über Werten von 0,8. Nach der receiver operating Kurvenanalyse (ROC) lag die diagnostische Effizienz (overall diagnostic accuracy) des GFAP- Tests zur Unterscheidung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung innerhalb des Zeitfensters von zwei bis sechs Stunden nach Symptombeginn stets über 0,8.

Abbildung 5

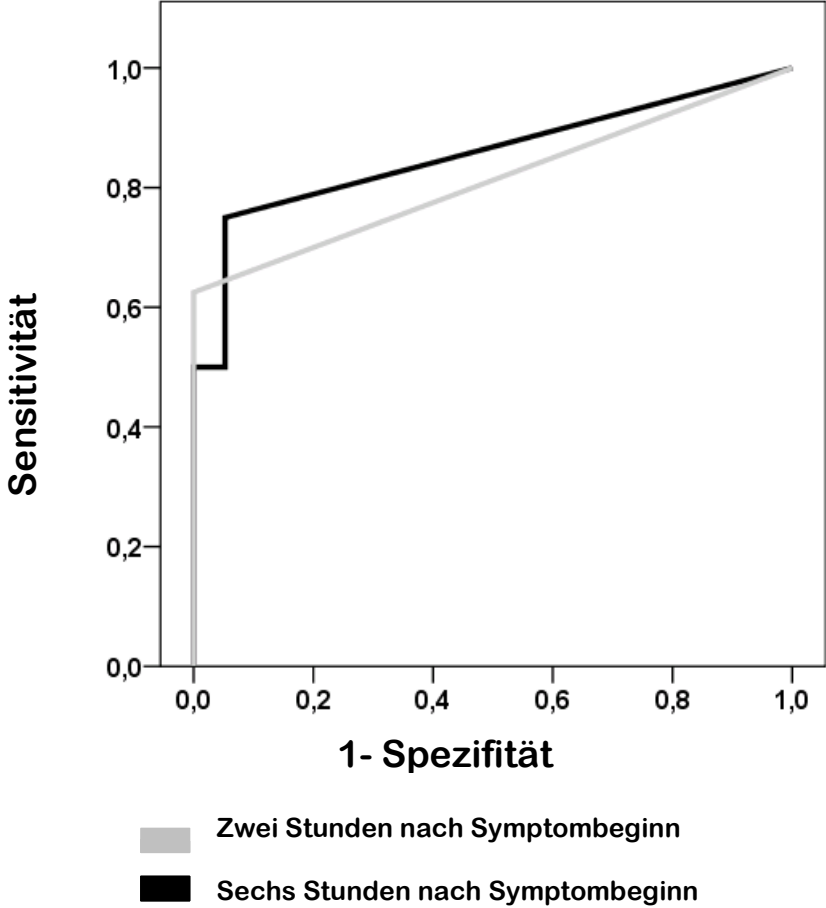


Abbildung 5 zeigt die ROC Kurvenanalyse zur Identifizierung von Patienten mit intrazerebraler Blutung 2 und 6 Stunden nach Symptombeginn

### **3.5 Grenzen der Methodik**

Im Falle der intrazerebralen Blutungen betrug das kleinste Blutungsvolumen, das noch zu einer Erhöhung der Serum-GFAP-Konzentration führte, 6,1 ml. Der Anstieg des GFAP Wertes wurde in diesem Fall drei Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome festgestellt. Das maximale Blutungsvolumen, das im Verlauf der Probenentnahmen nicht zu einer Erhöhung der GFAP- Konzentration führte, betrug 16 ml.

### **3.6 Korrelation der GFAP Serumkonzentration mit dem Blutungsvolumen bei der intrazerebralen Blutung**

Bei Patienten mit einer intrazerebralen Blutung besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der GFAP-Serumkonzentration und dem Blutungsvolumen. Die Anstiegszeitpunkte wurden in Verbindung mit der Größe der intrazerebralen Blutung in der folgenden Tabelle 4 gegenübergestellt:



	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h	48h
<15ml Blutungs-volumen	- (0%)	- (0%)	3 (50%)	4 (75%)	4 (75%)	3 (50%)	3 (50%)	2 (25%)
15-40ml Blutungs-volumen	1 (12,5%)	2 (25%)	4 (50%)	4 (50%)	4 (50%)	5 (62,5%)	6 (75%)	2 (25%)
>40ml Blutungs- volumen	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	3 (60%)

Tabelle 4: Die Patienten mit intrazerebraler Blutung wurden anhand des Blutungsvolumens drei Gruppen zugeordnet:

6 Patienten hatten ein Blutungsvolumen unter 15 ml, 8 Patienten hatten Blutungsvolumina zwischen 15 und 40 ml, bei 5 Patienten war das Blutungsvolumen größer als 40ml. Die Prozentangaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil der Patienten aus dieser Gruppe, die zum angegebenen Zeitpunkt bereits einen signifikanten Anstieg der Serum-GFAP-Konzentration aufwiesen.

Schon die Serumwerte, die zwei und drei Stunden nach Symptombeginn bestimmt wurden zeigten eine Korrelation zwischen Blutungsgröße und GFAP- Serumwert ( $r=0,755$ ;  $p=0,007$ ). Bei fünf von acht Patienten mit Blutungsvolumina über 15ml konnte man GFAP-Werte oberhalb der cut-off-points erkennen, drei Patienten mit kleineren Blutvolumina blieben unter den Cut-Off-Points. Nach sechs Stunden hatten neun von elf Patienten mit einem intrazerebralen Blutvolumen von über 15ml GFAP Werte über den Cut-Off-Points. Jedoch wurde dieser Schwellenwert nur bei einem von drei Patienten überschritten, bei denen das intrazerebrale Blutvolumen unter 15ml lag. Somit lässt sich festhalten, dass Blutungen von signifikanter Größe in einem relativ engen Zeitraum nach Symptombeginn durch Messung des GFAP Wertes nachgewiesen werden können.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die GFAP Serumkinetik**

Erste Untersuchungen der Serumkinetik des sauren glialen Faserproteins (GFAP) bei Schlaganfallpatienten zeigten, dass die GFAP-Konzentration bei Patienten mit intrazerebraler Blutung im Vergleich zu Patienten mit zerebraler Ischämie bereits in den ersten sechs Stunden nach Symptombeginn signifikant erhöht ist (Dvorak et al., 2008). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass GFAP als Biomarker in der Schlaganfalldiagnostik Verwendung finden könnte.

Wir konnten die Serumkinetik von GFAP bei ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen nun detailliert beschreiben und das diagnostische Zeitfenster zur Differenzierung beider Schlaganfall-Subtypen eingrenzen.

Bei den Patienten mit ischämischen Schlaganfällen zeigte sich in den ersten Stunden nach Symptombeginn kein Anstieg der GFAP Konzentration. Dieses Resultat korreliert gut mit vorausgegangenen Untersuchungen, die einen verzögerten Anstieg astroglialer Proteine (wie GFAP und S100B) im Serum von Patienten mit ischämischen Schlaganfällen beschreiben konnten (Herrmann et al., 2000). Maximalen Serumwerte von GFAP wurden in diesen Untersuchungen zwischen dem zweiten und dem vierten Tag nach Symptombeginn gemessen. Dieser verspätete Anstieg spiegelt wahrscheinlich die langsame Freisetzung aus nekrotisierenden Gliazellen in den Extrazellularraum sowie eine verzögerte Passage durch eine allmählich degradierte Blut-Hirn-Schranke wieder.

Es ist pathophysiologisch plausibel, dass bei der intrazerebralen Blutung die Blut-Hirn-Schranke wesentlich früher beschädigt und die Gliazellen rascher zerstört werden. Hierfür ist die massive Gewebsdestruktion durch das eindringende Blut verantwortlich.

Somit ist das gliale Faserprotein im Serum von Patienten mit hämorrhagischem Schlaganfall wesentlich früher messbar.

#### **4.2 Die Abhängigkeit der Wertigkeit von GFAP von dessen Bestimmungszeitpunkt**

Innerhalb der ersten Stunde nach Symptombeginn zeigten sich in der Blutuntersuchung noch keine Unterschiede zwischen Patienten mit intrazerebraler Blutung und ischämischem Schlaganfall. Zwischen zwei und sechs Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome konnten jedoch erhebliche Unterschiede festgestellt werden:

Die Konzentration von GFAP im Serum von Patienten mit intrazerebraler Blutung war signifikant höher als die der Ischämie-Patienten. Die diagnostische Sicherheit („overall accuracy“), mit der eine intrazerebrale Blutung von einer Ischämie unterschieden werden kann, liegt im Zeitfenster zwischen zwei und sechs Stunden nach Symptombeginn über 0,8. Wie bereits in vorangegangenen Studien schon gezeigt wurde, bestätigen auch unsere Untersuchungen, dass die Sensitivität unseres Tests einen Wert von 0,7 nicht übersteigt. Dies bedeutet, dass ein Teil der Patienten mit intrazerebraler Blutung mit dieser Methode nicht sicher erfasst werden kann.

Aufgrund der Korrelation zwischen der Blutungsgröße und dem im Serum bestimmten GFAP- Wert vermuten wir, dass kleinere Blutungen zunächst keine relevante Zerstörung der Gliazellen hervorrufen und somit auch kein GFAP- Spiegel im Serum messbar ist. Ein negativer GFAP- Wert im Serum schließt also das Vorliegen einer intrazerebralen Blutung nicht mit Sicherheit aus.

Die Spezifität des GFAP- Tests hingegen ist relativ hoch. Dies bedeutet, dass bei Patienten mit erhöhten Serum- GFAP- Werten in der Akutphase, ein ischämischer Schlaganfall praktisch ausgeschlossen werden kann. Ein positiver GFAP- Test hat also einen sehr hohen prädiktiven Wert für die Diagnose einer intrazerebralen Blutung. Möglicherweise stehen in der Zukunft spezifische Therapiemaßnahmen der intrazerebralen Blutung zur Verfügung, die dann in der Prähospitalphase eingeleitet werden können.

Negative Ergebnisse eines GFAP-Tests hingegen würden zunächst nicht ausreichen, um eine zerebrale Ischämie auszuschließen. Zudem ist die Verwendung eines GFAP Tests in der Frühphase der Schlaganfalldiagnostik eingeschränkt, da er innerhalb der ersten zwei Stunden nach Symptombeginn nur eine geringe Sensitivität bezüglich der Erkennung intrazerebraler Blutungen aufweist. Des Weiteren bleibt zu erwähnen, dass GFAP-Serumkonzentrationen nicht nur bei der intrazerebralen Blutung sehr früh erhöht sein können. Auch schwere Schädel-Hirn-Traumen (Pelinka et al., 2004) oder Glioblastome (Jung et al., 2007) können zu einem Anstieg des GFAP- Wertes im Blut führen.

Die Diagnostik eines ischämischen Schlaganfalls, die nur auf der Grundlage eines negativen GFAP-Tests basiert ist somit nicht möglich. Somit müssen vor der Einleitung weiterer Therapiemaßnahmen, wie beispielsweise einer Lysetherapie, zunächst weitere diagnostische Maßnahmen ergriffen werden, um eine intrazerebrale Blutung sicher auszuschließen.

Die Kombination eines GFAP- Tests mit weiteren spezifischen Biomarkern hingegen könnte für ischämische Infarkte zu einer noch größeren diagnostischen Sicherheit beitragen.

#### **4.3 Die Wertigkeit von GFAP in der Diagnostik des akuten Schlaganfalls im Vergleich zu CT und MRT**

Der Schlaganfall ist ein neurologischer Notfall, der geeignete diagnostische Maßnahmen vor der Einleitung einer spezifischen Therapie erfordert.

1971 begann mit der Einführung der Computertomographie eine neue Ära in der Diagnostik von Hirnerkrankungen. Im Jahre 1995 waren weltweit bereits 30 000 Computertomographen im klinischen Einsatz, 1997 standen allein in Deutschland 1 400 Geräte zur Verfügung (Busse et al., 2002). Die initiale Computertomographie des Schädels ist heute das Routineinstrument in der Diagnostik des akuten Schlaganfalls. Sie ist die Methode der ersten Wahl in der radiologischen Diagnostik zerebraler Notfälle, da sie fast überall verfügbar und schnell

durchführbar ist. Vor allem seitdem sich das Lyseverfahren in der Therapie der zerebralen Ischämie etabliert hat, ist es absolut notwendig, zuvor eine intrazerebrale Blutung ausgeschlossen zu haben (Thurnher et al., 2005). Die Computertomographie erlaubt mit einer Sicherheit von nahezu 100 % eine Identifikation intrazerebraler Blutungen bereits in der Frühphase des Schlaganfalls (Reynolds et al., 2003). Ischämische Schlaganfälle hingegen, zeigen sich im CT oft relativ spät oder sind zum Teil nicht ausreichend erkennbar. Vor allem in der therapeutisch entscheidenden Frühphase des Hirninfarktes ist es mittels kranialer CT nur schwer möglich, ischämisches Gewebe sicher abzugrenzen. Innerhalb der ersten drei Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome beträgt die Sensitivität der Nativ-Computertomographie für die Diagnose einer zerebralen Ischämie nur 50-70% (Nabavi et al., 1999). Bis zu 60% der kranialen CTs von Patienten mit ischämischem Schlaganfall sind in den ersten sechs Stunden unauffällig. Von Kummer und seine Mitarbeiter konnten 1996 in einer Studie sogar zeigen, dass bei ischämischen Schlaganfällen innerhalb der ersten 6 Stunden nach Symptombeginn 31% der CCT-Untersuchungen fehlinterpretiert wurden. Auch die Gabe von Kontrastmittel ist bei diesen Patienten meist nicht hilfreich, da innerhalb der ersten drei Tage nach Symptombeginn ein Kontrastenhancement meist nicht gesehen wird. Eine Kontrastmittelgabe wird deshalb in der Akutphase des Hirninfarktes nicht empfohlen (Kuriowa et al., 1999).

In diesem Fall liefern MRT-Aufnahmen bessere Ergebnisse als die Computertomographie. Gerade in der Frühphase eines ischämischen Schlaganfalls wird vor allem in größeren neurologischen Zentren häufig eine MR-Untersuchung angeschlossen, um das Infarktareal genauer abzugrenzen (Kuhn et al., 1999). Trotz der Einführung neuer MR-Techniken, die eine sehr zuverlässige Darstellung minderperfundierter Areale des Gehirns erlauben (Fiebach et al., 2002), konnte auch mit dieser Methode bisher kein Durchbruch in der Diagnostik des ischämischen Schlaganfalls erzielt werden. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass ein

MRT vor allem in kleineren Kliniken wesentlich schlechter verfügbar ist und weitaus höhere Kosten verursacht als die Computertomographie.

Die Ergebnisse der ECAS- (European Cooperative Acute Stroke)-Studie sowie der NINDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) zeigten hingegen, dass eine frühe Veränderung in der kranialen Computertomographie (CCT) von Schlaganfallpatienten mit einem eher schlechten Outcome verbunden sind, während ein initial normales CCT ein positiver Prädiktor für ein gutes Outcome des Patienten darstellt. Die Studie unterstreicht somit die Notwendigkeit einer Darstellung vom ischämisch geschädigtem Gewebe im CCT.

Die Behandlungsmöglichkeit des ischämischen Schlaganfalls durch eine Lysetherapie verlangt jedoch eine weitere Optimierung der Akutdiagnostik. Besonders kleinere Infarkte können sowohl im CT als auch im MRT oft nicht nachgewiesen werden. Dies macht eine Weiterentwicklung der Diagnoseverfahren erforderlich.

Ein GFAP Test könnte vor allem in der präklinischen Versorgung von Schlaganfallpatienten eine große diagnostische Hilfe sein. Es ist sehr wichtig, eine Differenzierung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung schnell und zuverlässig zu erzielen, da sich aus ihr enorme therapeutische Konsequenzen ergeben (Camarata et al., 1994). Bei positiven GFAP- Werten kann eine intrazerebrale Blutung mit hoher diagnostischer Sicherheit angenommen werden, sodass schon in der Frühphase der Erkrankung spezifische Therapiemaßnahmen eingeleitet und die Triage der Patienten optimiert werden können.

Ein GFAP-Test könnte außerdem in kleinen Kliniken, in denen ein CT zunächst nicht verfügbar ist, eine große Hilfe darstellen und die Möglichkeit bieten, die Patientenversorgung und –therapie weiter zu verbessern.

#### **4.4 Einsatzmöglichkeiten der Methode in der Klinik**

Seit Jahrzehnten sind bereits im Liquor nachweisbare ZNS- Marker bekannt und bilden einen zentralen Punkt in der neurologischen Forschung. Mit der Verbesserung der Nachweismethoden dieser Biomarker konnten zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen werden, die nun auch den weniger invasiven Nachweis der Marker im Blut ermöglichen. Durch die Freisetzung von GFAP aus geschädigten Zellen des ZNS ergibt sich die große Bedeutung dieses Biomarkers für die Diagnostik des akuten Schlaganfalls. Die Entwicklung eines verlässlichen GFAP- Tests würde eine Reihe neuer Perspektiven in der Akutversorgung von Schlaganfallpatienten eröffnen.

Akute Schlaganfälle werden nicht nur in spezialisierten Zentren, wie beispielsweise ausgewiesenen Stroke Units, behandelt, sondern häufig in städtischen Krankenhäusern, in denen nur eine sehr eingeschränkte Diagnostik möglich ist (Handschu et al., 2001). Vor diesem Hintergrund wäre es besonders hilfreich, wenn eine Früherkennung von intrazerebralen Blutungen bereits in der prähospitalen Phase erfolgte und so schon vor dem Eintreffen in der Klinik gezielte therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden könnten. GFAP bietet als ein früher diagnostischer Marker die Möglichkeit, klinische Abläufe bereits im Voraus zu bahnen und zu planen. So kann die Wahl der geeigneten Bildgebung, also die Entscheidung zwischen Computertomographie und Magnetresonanztomographie, bereits beim Eintreffen des Patienten in der Klinik getroffen werden. Auch die Zuweisung des Patienten auf eine Intensivstation, Intermediate Care Unit oder Normalstation kann bereits in der Frühphase erfolgen, da durch den GFAP- Test bereits nach zwei Stunden eine Aussage über den Subtyp des Schlaganfalls getroffen werden kann. Zusammengefasst stellt die Konzentrationsbestimmung von GFAP einen einfach zu erhebenden und kostengünstigen Parameter dar, der problemlos in die klinische Routine

einzuführen wäre und präzise quantitative Information über das Vorliegen einer intrazerebralen Blutung liefern könnte.

#### **4.5 Einschränkungen der Untersuchung**

Die Studie unterliegt jedoch gewissen Einschränkungen, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll:

1. Zunächst beruht das Ergebnis der Untersuchung auf einer eher kleinen Anzahl an untersuchten Proben.
2. Um die prädiktiven diagnostischen Möglichkeiten eines GFAP- Test genauer und sicherer zu untersuchen ist eine größere prospektive Studie nötig, die Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines akuten Schlaganfalls einschließt.
3. In unserer Untersuchung wurde ein anderer GFAP- Serum- Test verwendet als in der vorausgegangenen Untersuchung. Dies führte dazu, dass sich die unteren Messgrenzen und die Cut-Off-Werte von denen der vorausgegangenen Untersuchung unterscheiden.

In weiteren Untersuchungen wird es deshalb anhand standardisierter GFAP- Tests nötig sein, die unteren Messgrenzen neu festzusetzen und anzugleichen.



## 5. Zusammenfassung

### *Einleitung:*

Eine frühe Unterscheidung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung durch die Verwendung eines Biomarker-Tests könnte bereits in der prähospitalen Phase eine fallspezifische Akuttherapie ermöglichen.

Basierend auf einzelnen Messungen in der Akutphase des Schlaganfalls konnten wir zeigen, dass ein Anstieg des sauren glialen Faserproteins (GFAP) im peripheren Blut von Patienten mit intrazerebraler Blutung wesentlich früher messbar ist als bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, das diagnostische Zeitfenster des Serum- GFAP- Spiegels zur Differenzierung zwischen intrazerebralen Blutung und ischämischen Schlaganfall zu charakterisieren.

.

### *Materialien und Methoden:*

In diese prospektive Studie wurden 63 Schlaganfallpatienten eingeschlossen, die innerhalb von 6 Stunden nach Symptombeginn in der Klinik eintrafen. Mithilfe bildgebender Verfahren wurde bei 18 dieser Patienten eine intrazerebrale Blutung und bei 45 der Patienten ein ischämischer Schlaganfall diagnostiziert. Zu den Zeitpunkten von 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Symptombeginn wurden den Patienten Blutproben entnommen (wenn sie zu dieser Zeit zur Verfügung standen).

Im Serum dieser Proben wurde mittels eines ELISA-Tests die GFAP-Konzentration bestimmt.

### ***Ergebnisse:***

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Symptombeginn blieben die medianen GFAP-Werte im Serum der Ischämie-Patienten unterhalb der Nachweisgrenze. Die GFAP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit intrazerebraler Blutung hingegen waren bereits im Zeitraum zwischen 2 und 6 Stunden nach Symptombeginn signifikant höher als beim ischämischen Schlaganfall. ( $p < 0,001$  für alle 4 Zeitpunkte).

Unter der Verwendung der receiver operating characteristic curve Analyse lag die diagnostische Sicherheit von GFAP zur Differenzierung zwischen ischämischem und intrazerebraler Blutung bei  $>0,80$  innerhalb des 2-6 Stunden Zeitfensters. Die GFAP-Werte von Patienten mit intrazerebraler Blutung korrelierten zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Symptombeginn mit dem Blutungsvolumen ( $r=0,755$ ,  $p=0,007$ ).

### ***Zusammenfassung:***

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das Zeitfenster von 2-6 Stunden nach Symptombeginn bezüglich der Verwendung eines GFAP-Tests für die Differenzierung zwischen ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung geeignet zu sein scheint. In der sehr frühen Phase des Schlaganfalls (etwa  $<2$  Stunden) ist die Sensitivität des Tests zur Erkennung intrazerebraler Blutungen jedoch eher gering, was die Verwendung eines GFAP-Tests in der prähospitalen Phase limitiert.

## 6. **Abstract**

### ***Background:***

The rapid differentiation between intracerebral haemorrhage (ICH) and ischaemic stroke (IS) using biomarker testing would allow the prehospital, cause-specific management of stroke patients. Based on single measurements made during the acute phase of stroke, the value of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) was reported to be higher in ICH patients than in IS patients. The aim of the present study was to characterise the diagnostic window of serum GFAP for differentiating between ICH and IS.

### ***Methods:***

63 stroke patients admitted within 6 h of symptom onset were prospectively included. ICH (n = 18) and IS (n = 45) were diagnosed using brain imaging. Blood sampling was scheduled for 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 and 48 h after stroke onset (if applicable), and serum GFAP was measured using an ELISA test.

### ***Results:***

For the first 24 h after stroke, median GFAP values in IS patients remained below the detection limit. Between 2 and 6 h of stroke onset, serum GFAP was significantly higher in ICH patients than in IS patients ( $p < 0.001$  for all 4 time points). According to a receiver operating characteristic curve

analysis, the overall diagnostic accuracy of GFAP in differentiating between ICH and IS was  $> 0.80$  within the 2- to 6-hour time window. Two hours after stroke onset, serum GFAP values were significantly correlated with ICH volume ( $r = 0.755$ ,  $p = 0.007$ ).

***Conclusions:***

The time window between 2 and 6 h after stroke onset is best for using GFAP to differentiate between ICH and IS. In the very early phase (i.e.  $< 2$  h), sensitivity for detecting ICH is low, thus hampering the application of GFAP as a near-patient test in the prehospital phase.

## 7. Literaturverzeichnis

**Adams HP Jr.,** Brott TG, Crowell RM, Furlan AJ, Gomez CR, Grotta J, Helgason CM, Marler JR, Woolson RF, Zivin JA (1994) "Guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association." *Circulation* 90(3): 1588-601

**Albrechtsen M,** Massaro A, Bock E (1985) "Enzyme linked immunosorbent assay for the human glial fibrillary acidic protein using a mouse monoclonal antibody" *J Neurochem*, 560-566

**Astrup J,** Siesjö BK, Symon L (1981) "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." *Stroke* 12:723

**Aurell A.,** Rosengren LE, Karlsson B (1991) „Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction" *Stroke* 22:1254-1258

**Barber M,** Langhorne P, Rumley A (2004) "Hemostatic function and progressing ischemic stroke: D-dimer predicts early clinical progression." *Stroke* 35: 1421-1425

**Berger K,** Schulte H, Stogbauer F, Assmann G (1998) "Incidence and risk factors for stroke in an occupational cohort: the PROCAM Study. Prospective Cardiovascular Muenster Study." *Stroke* 29:1562-1566.

**Broderick JP,** Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G (1993) "Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality." *Stroke* 24: 987-993

**Broderick JP,** Conolly S, Feldman E, et al. (2007) "Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage in adults. Update." *Circulation* 116: e391-e413

**Busse O,** Arnold U, Ziegenhagen D-J (2002) "Evidenzbasierte Schlaganfall-Versorgung: Diagnostik und Akuttherapie. Stellenwert verschiedener Stroke-Unit-Modelle." Schattauer Verlag

**Camarata PJ,** Heros RC, Latachaw RE (1994) "Brain attack: the rationale for treating stroke as a medical emergency." *Neurosurgery* 34: 144-158

**Clark WM,** Albers GW, Madden KP, Hamilton S (2000) "The rtPA (alteplase) 0- to 6-hour acute stroke trial, part A (A0276g): results of a double-blind placebo-controlled, multicenter study. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke study investigators." *Stroke* 31: 811-816

**Collins R,** MacMahon S (1994) "Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease." *Br Med Bull* 50: 272-298

**Conley FK** (1979) "The immunocytochemical localization of GFA protein in experimental murine CNS tumors" *Acta Neuropathol. (Berl)* 45: 9-16

**DeArmond SJ**, Fajardo M, Naughton SA, Eng LF (1983) "Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: an electroblot study." *Brain Res* 262: 275-282

**DelZoppo GJ**, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ (2000) "Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia" *Brain Pathol* 10: 95-112

**Dereix L**, Adeleine P, Nighoghossian N, Honorat J, Trouillas P (2002) "Factors influencing early admission in a French stroke unit." *Stroke* 33: 153-159

**Donnan GA**, Davis SM, Chambers BR, Gates PC, Hankey GJ, McNeil JJ, Rosen D, Stewart-Wynne EG, Tuck RR (1996) "Streptokinase for acute ischemic stroke with relationship to time administration: Australian streptokinase (ASK) Trial Study Group." *Jama* 276 (12): 961-6

**Dvorak F**, Haberer I, Sitzer M, Foerch C (2008) „Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke." *Cerebrovasc Dis* 27: 37-41

**Eng LF**, Gerstl B, Vanderhaghen JJ (1970) „A study of proteins in old multiple sclerosis plaques" *Trans. Am. Soc. Neurochem.* 42

**Eng LF**, Rubinstein LJ (1978) „Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors" *J.Histochem. Cytochem.* 26:513-522

**Fiebach JB**, Schellinger PD, Jansen O, Meyer M, Wilde P, Bender J, Schramm P, Jüttler E, Öhler J, Hartmann M, Hähnel S, Knauth M, Hacke W, Sartor K (2002) "CT and diffusion-weighted-MR-Imaging in randomized order: DWI results in higher accuracy and lower interrater variability in the diagnosis of hyperacute ischemic stroke." *Stroke* 33(9): 2206-2210

**Foerch C**, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, Raabe A, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Sitzer M. (2006) „Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke" *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*77(2):181-4.

**Graham GD** (2003) "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke in clinical practice: a meta-analysis of safety data." *Stroke* 34: 2847-2850

**Hacke W**, Kaste M, Fieschi C (1995) "Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen Activator for acute Hemispheric Stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)." *JAMA.* 274, S.1017-1025.

**Hamann GF**, Isenberg E, Strittmatter M, Moili R, Schimrigk K (1993) "Big-endothelin in acute ischemic stroke." *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 3:256-260.

**Handschu R**, Garling A, Heuschmann PU, Kolominsky-Rabas PL, Erbguth F, Neundorfer B (2001) „Acute stroke management in the local general hospital.“ *Stroke* 32: 866-870

**Harraf F**, Sharma A, Brown M (2002) “A multicentre observational study of presentation and early assess of acute stroke.” *British Medical Journal*. 325, S. 17.

**Hardemark HG**, Persson L, Bolander HG, Hillered L, Olsson Y, Pahlmann (1988) “Neuron-specific enolase is a marker of cerebral ischemia and infarct size in rat cerebrospinal fluid” *Stroke* 19: 1140-1144

**Hennes HJ**, Heid F, Steiner T (1999) "Das präklinische Management des Patienten mit Schlaganfall" *Anaesthesist* 48:858-870

**Herrmann M**, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. (2000) "Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein." *Stroke.* ; 31: 2670–2677

**Heuschmann PU**, Berger K, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Adelman M, Buecker-Nott HJ, Rother J, Neundorfer B, Kolominsky-Rabas PL (2003) “Frequency of thrombolytic therapie in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital-mortality: the German Stroke Registers Study Group.” *Stroke* 34: 1106-1113

**Johnston F**, Wardlaw J, Dennis MS (1999) “Delays in stroke referrals.” *The Lancet*. 354, S. 47-48.

**Jung CS**, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007) “Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma mutliforme.” *Brain* 130: 3336-3341

**Jüttler E**, Steiner T (2007) “Treatment and prevention of spontaneous intracerebral hemorrhage: comparison of EUSI and AHA/ASA recommendations.“ *Expert Rev Neurother.* 7: 1401-1406

**Kettenmann H**, Ransom BR (1995). " Neuroglia". Oxford University Press.

**Kothari R**, Jauch E, Broderick J, Brott T, Sauerbeck I, Khoury J, Liu T (1999) „Acute stroke: delays to presentation and emergency department evaluation.“ *Ann Emerg Med* 33: 3-8

**Kuhn S**, Reith W, Ertl-Wagner B, Elste V, Sartor K (1999) “Comparison of computer tomography and magnetic resonance tomography in the diagnosis of intracerebral hemorrhage.” *Radiologe* 39: 855-859

**Kuriowa T**, Kaijamoto Y, Ohta T (1999) “Comparison between operative findings on malignant glioma by flourescein surgical microscopy and histological findings.” *Neurol Res* 21: 130-134

**Lynch JR**, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. (2004) ”Novel diagnostic test for acute stroke” *Stroke.* ;35(1):57-63. Epub 2003 Dec 11.

- Marchi N**, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D (2004) „Peripheral markers of blood-brain barrier damage.“ *Clinica chimica acta* 342: 1-12
- Mayer SA**, Brun NC, Broderick J, Davis S, Diringer MN, Skolnick BE, Steiner T (2005) “Europe/AustralAsia NovoSeven ICH Trial Investigators. Safety and feasibility of recombinant factor VIIa for acute intracerebral hemorrhage.” *Stroke* 36: 74-79
- McGirt MJ**, Blessing R, Nimjee SM (2004) “Correlation of serum brain natriuretic peptide with hyponatremia and delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage.” *Neurosurgery* 54: 1369-1374
- Mendelow AD**, Gregson BA, Fernandes HM, Murray GD, Teasdale GM, Hope DT, Karimi A, Shaw MD (2005) “Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial.” *Lancet* 365 (9457): 361-2
- Missler U**, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M (1997) “S-100 Protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis of acute ischaemic stroke.“ *Stroke* 28:1956-1960
- Mori T**, Morimoto K, Ushio Y, Hayakawa T, Mogami H (1975) “Radioimmunoassay of astroprotein (an astrocyte-specific cerebroprotein) in cerebrospinal fluid from patients with glioma. A preliminary study.” *Neurol med Chir (Tokyo)* 15: 23-5
- Mori T**, Morimoto K, Hayakawa T, Ushio Y, Mogami H, Sekiguchi K (1998) “Radioimmunoassay of astroprotein (an astrocyte-specific cerebroprotein) in cerebrospinal fluid and its clinical significance.” *Neurol Med Chir (Tokyo)* 18:25-31
- Nabavi DG**, Cenic A, Craen RA, Gelb AW, Bennett JD, Kozak R, Lee TY (1999) “CT assessment of cerebral perfusion: experimental validation and initial experience.” *Radiology* 213: 141-149
- Nylen K.**, Csajbok L., Ost M.( 2007):"Serum Glial Fibrillary Acidic Protein Is Related to Focal Brain Injury and Outcome After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke.*;38:1489
- Pelinka LE**, Kroepfl A, Schmidhammer R, Krenn M, Bruchinger W, Redl H, Raabe A (2004) “Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma.” *J Trauma* 57 : 1006-1012
- Raabe A**, Seifert V (2000) „Protein S-100B as a serum marker of brain damage in severe head injury: preliminary results“ *Neurosurgical Review* 23:136-138
- Reed SD**, Cramer SC, Blough DK, Meyer K, Jarvik JG (2001) “Treatment with tissue plasminogen activator and inpatient mortality rates for patients with ischemic stroke treated in community hospitals.” *Stroke* 32: 1832-1840



**Reynolds M**, Kirchick H, Dahlen J, Anderberg J, McPherson P, Nakamura K, Laskowitz D, Valkirs G, Buechler K (2003) „Early Biomarkers of Stroke“ *Clinical Chemistry* 49: 1733-1739

**Riggs RV**, Andrews K, Roberts P, Gilewski M (2007) “Visual deficit interventions in adult stroke and brain injury: a systematic review.” *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*, 86(10): 853-860

**Sammler E.**, Juettler E, Geletneky K, Steiner T (2006) "Therapie der spontanen intrazerebralen Blutung" *Nervenarzt* 77:39-50

**Steiner T.**, Hennes HJ, Kretz R, Hacke W (2000) "Akute klinische Schlaganfallbehandlung" *Anaesthesist* 49:2-8

**Steiner T**, Rosand J, Diring M (2006) "Intracerebral hemorrhage associated with oral anticoagulant therapy: current practices and unresolved questions" *Stroke* 37: 256-262

**Steiner T**, Kaste M, Forsting M, et al. (2006) „Recommendations for the management of intracerebral hemorrhage – part I: spontaneous intracerebral hemorrhage.“ *Cerebrovasc Dis.* 22: 294-316

**Tacconi MT** (1998) “Neuronal death: Is there a role for astrocytes?” *Neurochem Res* 23(5): 759-65

**Thomalla G**, Köhrmann M, Röther J, Schellinger PD (2007) “Effective Acute Stroke Treatment Beyond Approval Limitations: Intravenous Thrombolysis within an Extended Time Window (3-6 h) and in Old Patients (aged 80 or older).” *Fortschr Neurol Psychiat* 75: 343-350

**Thurnher MM**, Castillo M (2005) “Imaging in acute stroke.” *Eur Radiol* 15(3): 408-415

**Uden J**, Christensson B, Bellner J, et al. (2004) “Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease” *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36:10-13

**Uyeda CT**, Eng LF, Bignami A, (1972) “Immunological study of the glial fibrillary acidic protein” *Brain Res.* 37(1):81-9.

**v. Kummer R**, Holle R, Gizyska U, Hofmann E, Jansen O, Petersen D (1996) „Interobserver agreement in assessing early CT signs of middle cerebral artery infarction.“ *AJNR* 17: 1743-8

**Vos PE**, van Gils M, Beems T, Zimmermann C, Verbeek MM (2006) “Increased GFAP and S100beta but not NSE serum levels after subarachnoid haemorrhage are associated with clinical severity” *European Journal of Neurology* 13 (6):632-638

**Wardlaw J**, Berge E, del Zoppo G, Yamaguchi T (2004) „Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke“ *Stroke* 35: 2914

**Warren KG**, Catz I, Ferenczi LZ, Krantz MJ (2006) “ Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment.” *Eur J Neurol.* 13 (8) 887-95

**Weimar C**, Benemann J, Huber R, Mieck T, Kaendler S, Grieshammer S, Katsarava Z, Diener HC (2000) „Long-term mortality and risk of stroke after transient ischemic attack: A hospital-based cohort study“ *J Neurol* 256(4): 639-44

**Weinstein DE**, Shelanski ML, Liem RK (1991) “Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic process in response to neurons.” *J cell Biol* 112: 1205-1213

**Woertgen C**, Rothoerl RD, Holzschuh M, Metz C, Brawanski A (2002) “Glial and neuronal serum markers after controlled cortical impact injury in the rat.” *Acta Neurochir Suppl.* 81: 205-7

**Wunderlich MT**, Wallesch CW, Goertler M (2006) “ Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neurovascular status in acute ischemic stroke.” *Eur J Neurol* 13(10): 1118-23

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. med. Matthias Sitzer dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, die hier vorliegende Promotion in der Klinik für Neurologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchführen zu können.

Ich möchte mich außerdem besonders bei Dr. med. Christian Förch für die Überlassung des Themas und die geduldige und kompetente Unterstützung und Betreuung der Arbeit bedanken. Er war in allen Fragen mein erster Ansprechpartner und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren danke ich Dr. med. Florian Dvorak für die unterstützende Betreuung, die gute Zusammenarbeit und die große Hilfe bei der während meiner Arbeit im Forschungslabor.

Mein Dank gilt auch dem Team des klinischen Labors der Neurologischen Klinik der Universitätsklinik Frankfurt für die gute Zusammenarbeit und die bereitwillige Hilfe.

Außerdem danke ich natürlich allen Patienten für die bereitwillige Teilnahme an dieser Studie.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für die Geduld und das immer dargebrachte Verständnis.

## **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Charakterisierung der Serum-Kinetik des sauren glialen Faserproteins (GFAP) bei Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall und intrazerebraler Blutung“**

in der Klinik für Neurologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Betreuung und Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Matthias Sitzer und mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. Christian Foerch und Herrn Dr. med. Florian Dvorak ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und dass ich bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

**Florian Dvorak, Isabel Haberer, Matthias Sitzer, Christian Foerch**

***Characterisation of the Diagnostic Window of Serum Glial Fibrillary acidic Protein for the Differentiation of Intracerebral Haemorrhage and Ischaemic Stroke***

**Cerebrovascular Diseases 2009, 27: 37- 41**

Hainburg, Januar 2010

Isabel Haberer