

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Baethmann

**Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der
globalen zerebralen Ischämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jürgen Beck

aus

Nördlingen

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Baethmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Walzog

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. G. Hamann
2. Priv. Doz. Dr. St. Linder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Eberhardt Uhl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 04. 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
	1.1 Vorbemerkung	7
	1.2 Sekundärer Hirnschaden	8
	1.3 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie – Reperfusionsschaden	9
	1.4 Aktivierung von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie	9
	1.5 Stand der Forschung	10
	1.6 Ziel der Studie	11
2	Material und Methoden	13
	2.1 Versuchstiere und Haltung	13
	2.2 Experimentelles Modell	13
	2.2.1 Narkose	13
	2.2.2 Präparation	14
	2.3 Laser-Doppler-Fluxmetrie	15
	2.4 Intravitalmikroskopie	17
	2.4.1 Prinzip der Epiillumination	17
	2.4.2 Aufbau des Intravitalmikroskops	18
	2.4.3 Fluoreszenzfarbstoffe	20
	2.4.4 Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser	21
	2.4.5 Leukozyten-Endothelinteraktionen	22
	2.4.6 Kapillardichte	22
	2.4.7 Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS)	23
	2.4.8 Arteriovenöse Transitzeit	23
	2.5 Körpergewicht	26
	2.6 Neurologische Untersuchung	26
	2.7 Histologie	27
	2.8 Quantitative Histomorphometrie	28
	2.9 Histochemischer Nachweis von neutrophilen Granulozyten durch Esterasefärbung	31
	2.10 Versuchsgruppen und Protokolle	32
	2.10.1 Frühe Reperfusion – bis 3 Stunden nach Ischämie	32
	2.10.2 Späte Reperfusion – 6 und 7 Stunden nach Ischämie	33
	2.11 Statistik	34
3	Ergebnisse	35
	3.1 Kontrollparameter	35
	3.1.1 Makrohämodynamik	35
	3.1.2 Blutgase, Blutzucker, Hämatokrit und Leukozyten im peripheren Blut	36
	3.2 Zielparameter	37
	3.2.1 Gefäßdurchmesser	37
	3.2.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie	38

3.2.3	Arteriovenöse Transitzeit	40
3.2.4	Korrelation LDF und AVTT	41
3.2.5	Leukozyten-Endothelinteraktionen – Leukozytenrollen	43
3.2.6	Leukozyten-Endothelinteraktionen – Leukozytenadhärenz	44
3.2.7	Leukozytenrollen – späte experimentelle Phase	47
3.2.8	Leukozytenadhärenz – späte experimentelle Phase	47
3.2.9	Gefäßdurchmesser in der späten experimentellen Phase	48
3.2.10	Kapillardichte	49
3.2.11	Blut-Hirnschranke	50
3.2.12	Körpergewicht	51
3.2.13	Neurologischer Score	52
3.2.14	Histologie	53
3.2.15	Esterasefärbung	58
3.3	Korrelationsanalysen	59
3.3.1	Leukozyten-Endothelinteraktionen und histologischer Schaden	59
3.3.2	Leukozyten-Endothelinteraktionen und neurologisches Defizit	63
3.3.3	Ischämischer Nervenzellverlust und neurologisches Defizit	63
4	Diskussion	64
4.1	Methodik	64
4.1.1	Das experimentelle Modell	64
4.1.2	Versuchstiere	66
4.1.3	Dauer der Ischämie	67
4.1.4	Intravitalmikroskopie der zerebralen Mikrozirkulation	68
4.1.5	Quantifizierung der zerebralen Durchblutung	73
4.1.6	Neurologische Untersuchung	76
4.1.7	Histologie	78
4.2	Ergebnisse	79
4.2.1	Kontrollparameter	79
4.2.2	Zerebrale Durchblutung	80
4.2.3	Neuroscore und Nervenzelluntergang	84
4.2.4	Mechanismen der ischämischen Zellschädigung	85
4.2.5	Leukozyten-Endothelinteraktionen	92
4.2.6	Leukozyten und sekundärer Hirnschaden	97
5	Zusammenfassung und Ausblick	103
6	Schriftumsverzeichnis	106
7	Danksagung	120
8	Lebenslauf	121

Verwendete Abkürzungen:

(international gebräuchliche Abkürzungen werden beibehalten)

A./Aa.	Arteria/Arteriae
AVTT	Arteriovenöse Transitzeit
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BHS	Blut-Hirnschranke
CA	Cornu ammonis, Ammonshorn des Hippocampus
CAMAS	Computer assisted microcirculation analysis system
CBF	Hirndurchblutung (cerebral blood flow)
CCD	Charge coupled device (Chip in elektronischen Videokameras)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dx	Dextran
EEG	Elektroenzephalogramm
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
ICAM	Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
ICP	Intrakranieller Druck (intracranial pressure)
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
IVM	Intravitalmikroskopie/Intravitalmikroskop
KD	Kapillardichte
KLSM	Konfokale-Laser-scanning Mikroskopie
LDF	Laser-Doppler-Fluxmetrie
LEI	Leukozyten-Endothelinteraktionen
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MCA	Arteria cerebri media (middle cerebral artery)
MG	Molekulargewicht
MHC	Major histocompatibility complex
MW	Mittelwert/Molekulargewicht
N./Nn.	Nervus/Nervi
NFκB	Nuclear-factor κB (Transkriptionsfaktor)
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (platelet activating factor)
PMNL	Granulozyt (polymorphonuclear leukocyte)
rCBF	regionale Hirndurchblutung (regional cerebral blood flow)
ROI	Region of interest
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SND	Selektiver Nervenzelltod (selective neuronal death)
SITS	hochempfindliche Röhrenkamera (silikon-intensified target system)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V.	Vena

Einleitung

1.1. Vorbemerkung

Ischämie ist die Abnahme der Durchblutung, die je nach Ausmaß zur Störung oder Hemmung der Funktion, des Metabolismus und Schädigung der Struktur führt (83). Die zerebrale Ischämie hat erhebliche klinische und epidemiologische Bedeutung. Grundsätzlich kann zwischen einer globalen und fokalen Manifestation unterschieden werden (196). Eine *globale zerebrale Ischämie* liegt bei einer Durchblutungsabnahme vor, die das ZNS insgesamt oder den größten Teil beider Hemisphären betrifft. Zu einer globalen Ischämie des Gehirns kommt es vor allem beim Herz-Kreislaufstillstand, beim Kind im Rahmen von geburtshilflichen Komplikationen, bei Narkosezwischenfällen mit Blutdruckabfall, Polytrauma mit schwerem Blutverlust, oder als Folge von Herzrhythmusstörungen mit arterieller Hypotension. Die regionale oder fokale zerebrale Ischämie ist hingegen auf bestimmte Bereiche des Gehirns, z. B. auf das Versorgungsgebiet einer intrakraniellen Arterie, beschränkt. Eine akut auftretende fokale zerebrale Ischämie liegt dem ischämischen Schlaganfall mit Hirninfarkt zugrunde. Die Ursache ist im wesentlichen eine Stenosierung oder ein Verschluss einzelner Hirnarterien, meist als Folge einer Thrombose oder eines Embolus (158). Ischämische Hirninfarkte können auch durch Thrombosierung oder durch eine verminderte Drainage – z. B. in Folge einer Hirnschwellung nach Trauma – größerer Hirnvenen und der venösen Blutleiter (Sinus) des Gehirns entstehen. In westlichen Industrienationen erleiden jährlich 200-300 Patienten pro 100 000 Einwohner einen apoplektischen Insult – Schlaganfall – in 85% der Fälle aufgrund einer fokalen zerebralen Ischämie, in 15% aufgrund einer spontanen intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutung (23;220). 15-20% der Patienten mit ischämischem Infarkt versterben innerhalb der ersten 30 Tage (165). Überlebende haben oft schwerwiegende neurologische Defizite wie Lähmungen, Sprach-, oder Verhaltensstörungen. Ischämische Sekundärveränderungen dagegen treten auch beim schweren Schädel-Hirn-Trauma auf (86;87) und können die Prognose ungünstig beeinflussen. Jüngere Untersuchungen von Murray haben gezeigt, dass die Ischämie des ZNS nach den Herz-Kreislaufkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache darstellt (140;159), in den westlichen Industrienationen ist sie die dritthäufigste Todesursache (57).

1.2. Sekundärer Hirnschaden

Ablauf und weitergehende Details der pathophysiologischen Prozesse, die zum ischämischen Parenchymschaden nach einem Insult führen, sind nur fragmentarisch bekannt. Es besteht jedoch kein Zweifel, dass zusätzlich zum primären Insult die sekundäre Hirnschädigung nach Ischämie einen wesentlichen Anteil hat. Der *sekundäre Hirnschaden*, d. h. der irreversible Untergang von Hirnparenchym entwickelt sich mit einer Verzögerung von Stunden bis Tagen (15;198). Ito hat 1975 nach Untersuchungen bei der globalen zerebralen Ischämie mit Mongolischen Wüstenrennmäusen – Gerbils – ein *Maturation phenomenon* als Äquivalent erstmals beschrieben (104). Er fand, dass Neurone vom Gerbil in selektiv vulnerablen Hirnarealen wie Hippocampus nach einem ischämischen Insult (15 min Dauer) nicht unmittelbar zugrunde gehen, sondern dass der Zellschaden erst nach einer Woche vollständig ist. Der verzögerte Nervenzelltod als pathogenetisches Prinzip ist sowohl bei der fokalen (104) als auch bei der globalen zerebralen Ischämie (116) bei verschiedenen Versuchsspezies beobachtet worden (181;244). Das *Maturation phenomenon* spielt auch bei Patienten mit zerebraler Ischämie eine wesentliche Rolle für das Ausmaß des Gewebes Schadens und somit für die Prognose, wie neuere kernspintomographische Untersuchungen zeigen (20;57). Zahlreiche Experimente haben bestätigt, dass in selektiv vulnerablen Arealen des Gehirns, unmittelbar nach Ischämie tatsächlich nur ein reversibles Funktionsdefizit vorherrscht, dass sich Energiestoffwechsel und Funktion erholen können (100;123;150;172). Andererseits kann es nach Stunden und Tagen zu einer *erneuten sekundären* Verschlechterung der Funktion kommen, schließlich zum Absterben von Neuronen. Aufgrund entsprechender Beobachtungen bei der globalen zerebralen Ischämie beim Gerbil ist der Begriff des *verzögerten* Nervenzelltodes – *delayed neuronal death* – geprägt worden (116). Auch bei Patienten mit globaler zerebraler Ischämie, z. B. nach Herzstillstand, kommt es zum *verzögerten* neuronalen Zelltod (6).

Der *sekundäre Hirnschaden* ist nicht nur als Manifestation der Vergrößerung des Parenchyms Schadens mit Verschlechterung der Prognose von Bedeutung, sondern auch aus therapeutischer Perspektive. Die Entstehung des sekundären Parenchyms Schadens kann, im Gegensatz zum Primärschaden, therapeutisch prinzipiell gehemmt werden, vorausgesetzt, die zugrundeliegenden Mechanismen sind bekannt und lassen sich beeinflussen.

1.3. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie – Reperfusionsschaden

Mit Eintritt einer Durchblutungsstörung werden vielfältige Mechanismen aktiviert, die Ausmaß wie Ablauf des Parenchymschadens entscheidend beeinflussen. Unter anderem kommt es zur interstitiellen Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren, zur Periinfarktdepolarisation (100), Azidose, Bildung und Freisetzung von Mediatorsubstanzen wie PAF, Endothelin, Arachidonsäure und ihren Metaboliten, von freien Radikalen, bis hin zur Aktivierung der Entzündungskaskade durch Zytokine und einer Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems (139).

Die nach Ischämie einsetzende Reperfusion kann den ischämischen Gewebeschaden weiter verstärken. Der Terminus *Ischämie/Reperfusionsschaden* beschreibt die paradoxe Tatsache, dass die für das Überleben des Gewebes essentielle Reperfusion den ischämischen Parenchymschaden vergrößern kann (145). Allerdings hat ein Ausbleiben der prompten Rezirkulation des Gehirns nach globaler Ischämie den Hirntod unweigerlich zur Folge.

1.4. Aktivierung von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie

Die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten als Mediatoren ist ein zentraler Punkt der oben genannten Hypothese über den Ischämie/Reperfusionsschaden. Weiße Blutkörperchen haben als Zellen der Abwehr des Organismus auch bei der Demarkation und Narbenbildung von infarziertem Gewebe eine entscheidende Funktion. Andererseits entfalten diese Blutzellen nach ihrer Aktivierung ein enorm toxisches Potenzial und könnten dadurch zum sekundären Hirnschaden beitragen (235). Als Mediatoren spielen in intrazellulären Vakuolen gespeicherte hydrolytische Proteasen, z. B. Elastase und Kollagenase, die von aktivierten Granulozyten sezerniert werden, eine wichtige Rolle. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff katalysieren Leukozytenenzyme wie NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase die Bildung reaktiver Oxidantien und freier Radikale. Hierzu gehören u. a. hypochlorige Säure, Hydroxylradikale und das langlebige Peroxinitrit. Diese Radikale peroxidieren ungesättigte Fettsäure, die entstehenden Lipoperoxide schädigen ihrerseits in einer Kettenreaktion die Zellmembran. Von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Zytokine, wie TNF- α , IL-1, -6 und -8 spielen nicht nur bei der weiteren Aktivierung von Leukozyten eine Schlüsselrolle, sondern locken durch Chemotaxie Entzündungszellen an. Ein wichtiger Mediator ist PAF – Plättchen aktivierender Faktor –, der ebenfalls von Leukozyten nach

Ischämie produziert wird. PAF ist zentraler Faktor bei der Expression von Adhäsionsmolekülen, die für die Entwicklung des Reperfusionsschadens des Gehirns eine wichtige Rolle spielen (224;225). Außerdem aktiviert PAF Blutplättchen, wodurch die Bildung von Mikrothromben induziert werden kann. Schließlich kommt es, u. a. durch das intrazelluläre Ca^{++} -Overload, zur Aktivierung von Phospholipase A2 mit Freisetzung von Arachidonsäure. Ihre Metabolisierung via Lipo- und Cyclooxygenase produziert vasoaktive Substanzen und freie Radikale in pathologisch wirksamen Konzentrationen (122). Diese Vorgänge werden für das sekundäre Absinken der Gewebepfusion und die Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke verantwortlich gemacht. Schließlich sollen polymorphkernige Granulozyten aufgrund ihrer veränderten rheologischen Fließeigenschaften nach Ischämie die Kapillarperfusion vollständig blockieren (53).

1.5. Stand der Forschung

Ames und Mitarbeiter (5) haben bereits 1968 postuliert, dass Ischämie die Eigenschaften von Blut verändert – *ischemia may modify the state of the blood* – und dadurch die Rezirkulation nach globaler Ischämie beeinträchtigt, als wichtigen Pathomechanismus des sekundären Gewebeuntergangs. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wird dabei als ein wesentlicher Vorgang angesehen (51). Seitdem sind zahlreiche Befunde erhoben worden, die sowohl für als auch gegen eine Beteiligung von aktivierten Leukozyten am ischämischen Sekundärschaden des Gehirns sprechen. Hallenbeck (93) und del Zoppo (53) haben eine Akkumulation von Leukozyten im ischämischen Hirngewebe gefunden, einschließlich Verlegung von Mikrogefäßen durch diese Zellen. Von der Gewebeinvasion durch Leukozyten abgesehen (75;76), ist es wiederholt beobachtet und bestätigt worden, dass die Inhibition dieses Vorganges, u. a. durch Anti-Leukozytenserum (21) oder Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle (29;38;43;44) bei der zerebralen Ischämie protektiv ist, ebenso durch die Verwendung genetisch veränderter Mäuse mit eingeschränkter Leukozytenfunktion (46;178;200;201).

Während bei der *fokalen* zerebralen Ischämie eine Beteiligung von aktivierten Leukozyten am sekundären Hirnschaden experimentell gesichert erscheint (96), wird deren Funktion bei der *globalen* Ischämie nach wie vor kontrovers diskutiert. In Untersuchungen mit globaler Ischämie ist das Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen intravitalmikroskopisch nur bei neugeborenen Ferkeln beobachtet worden. Abels oder Dirnagl hingegen haben bei der

globalen Ischämie des Gehirns keine signifikante Akkumulation von Leukozyten in Piagefäßen von Ratten gefunden (2;177). Bei anderen Experimenten mit Ratten kam es nur zur Aktivierung von Leukozyten bei der globalen Ischämie, wenn die Reperfusion des Gehirns wegen einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks beeinträchtigt war (103). Die Interpretation der vorhandenen Ergebnisse wird erschwert durch die Variabilität von Methoden und Spezies, mit denen die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen Ischämie bisher untersucht worden ist – auch fehlen chronische Experimente, womit der endgültig resultierende Gewebeschaden und das neurologische Defizit zuverlässig quantifiziert werden könnte. Demnach ist es bisher nicht gelungen, einen kausalen Zusammenhang herzustellen zwischen der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und dem Ausmaß des ischämischen Gewebeschadens bzw. des neurologischen Defizits nach globaler Ischämie.

1.6. Ziel der Studie

Das Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen im Hinblick auf den sekundären Hirnschaden bei der globalen zerebralen Ischämie.

1. Zunächst sollte ein experimentelles Modell etabliert werden, womit die zerebrale Mikrozirkulation unter besonderer Berücksichtigung von Ausmaß und Kinetik von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie analysiert werden kann.

Um die Auswirkungen der Leukozytenaktivierung erfassen zu können sollte:

2. der Gewebeschaden des Gehirns nach Ischämie im histologischen Präparat einschließlich Untergang von Nervenzellen in selektiv vulnerablen Hirnarealen quantifiziert werden.
3. das Outcome von Versuchstieren durch Untersuchung des neurologischen Defizits, von Gewichtsverlust und Verhaltensauffälligkeiten erfasst werden.

4. das Ausmaß der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen mit dem Schweregrad des ischämischen Gewebeschadens und des funktionellen Defizits korreliert werden.

Um die experimentelle Fragestellung beantworten zu können, wurde ein chronisches Modell mit längerem Überleben der Versuchstiere entworfen, das erstmals eine quantitative Analyse der zerebralen Mikrozirkulation mit Beobachtungen von Verhalten und Funktionsausfällen und Quantifizierung des histopathologischen Gewebeschadens beim selben Versuchstier kombiniert. Ein zentraler Bestandteil der Methodik war die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Diese Technik ermöglicht eine direkte Beobachtung der mikrovaskulären Durchblutung mit quantitativer Beurteilung von Leukozyten-Endothelinteraktionen sowie von Veränderungen der Vasomotorik.

Material und Methoden

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben AZ 211-2531-7/92) im Zeitraum 1994 bis 1997 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians Universität, München. Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Fördernummer Uh/64-2) unterstützt.

2.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden 10-14 Wochen alte, männliche Mongolische Wüstenrennmäuse (Gerbils), *Meriones unguiculatus*, mit einem Körpergewicht von 60-80 g verwendet. Eigens für Tierversuche gezüchtete Gerbils wurden von Fa. Savo-Ivanovas (Kissleg, Allgäu) beschafft. Mit diesen Tieren wurde im Institut für Chirurgische Forschung eine eigene Zucht etabliert. Den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetz (Bundesgesetzblatt vom 18.01.1986) entsprechend wurden je 3-4 Tiere in Makrolonkäfigen Typ 3 bei 22°C und 60% Luftfeuchtigkeit bei 12-stündigem Hell-Dunkelrhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, mit 18.000 I.E./kg Vit. A, 1280 I.E./kg Vit. D3 und 120 mg/kg. Vit. E). Nach Beendigung des Akutversuchs wurden die Tiere zur postoperativen Beobachtung in Einzelkäfigen untergebracht.

2.2 Experimentelles Modell

2.2.1 Narkose

Die Betäubung der Tiere erfolgte mit 4 Vol.% Halothan (Hoechst, Frankfurt) bis zum Erlöschen der motorischen Aktivität. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde eine gepolsterte Atemmaske mit je einer Öffnung für das Narkosegasgemisch und für die Absaugung der Expirationsluft verwendet. Während der Präparation betrug der Halothananteil 2%, für die Intravitalmikroskopie 0,8%, während Ischämie 0,4%, bei einem mit Hilfe eines Oxymeters (Oxydig, Drägerwerke, Lübeck) kontrollierten inspiratorischen Sauerstoffanteil von 26%. Die Dosierung des Narkosegasgemischs war auf 1 l/min eingestellt.

Die Körpertemperatur wurde über die Dauer des Versuchs mit einer rektalen Sonde kontrolliert und mit rückgekoppelter Heizplatte (Effenberger, Pfaffing) bei 37°C eingeregelt. Nach Abschluss der Wundversorgung wurde die Narkose beendet, woraufhin die Tiere unter Beobachtung in Einzelkäfigen aufwachten.

2.2.3 Präparation

Die mikrochirurgischen Eingriffe erfolgten unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Zeiss, Oberkochen). Je ein Polyäthylenkatheter (Portex, England) mit äußerem Durchmesser von 0,61 mm wurde in die A. caudalis und V. femoralis zur Messung des arteriellen Drucks und zur Infusion der Fluoreszenzindikatoren implantiert. Der arterielle Druck wurde mit einem PPG Servometer (Hellige, Freiburg) mit Hilfe eines Statham Druckmaßwandlers (P23XL-1, Spectramed, Düsseldorf) gemessen. Die Druckmesskatheter wurden mit einer Infusionspumpe (Perfusor segura, B.Braun, Melsungen) mit physiologischer Kochsalzlösung kontinuierlich (Fresenius, Bad Homburg) gespült (0,2 ml/h).

Nach Hautinzision kranial vom Sternum wurde die A. carotis communis beidseits unter Schonung der benachbarten Nn. vagi freigelegt. Um den Eintritt der Ischämie intravitalmikroskopisch beobachten zu können, wurden beide Aa. carotides communes zunächst mit einem monofilen Prolenefaden der Stärke 5-0 (Ethicon, Norderstedt) locker umschlungen, ohne deren Durchblutung zu beeinträchtigen. Zu einem späteren Zeitpunkt (s. Protokoll) erfolgte die Karotisokklusion durch Anhängen einer 15 g schweren chirurgischen Klemme an beide Fadenenden. Gerbils haben bekanntlich als anatomische Besonderheit einen unvollständigen Circulus arteriosus willisi (132). Das Fehlen oder die Insuffizienz von Anastomosen zwischen dem vorderen Stromgebiet der Aa. carotides internae und dem hinteren Stromgebiet der Vertebralarterien ermöglicht damit die Induktion einer Großhirnischämie durch die Unterbindung von beiden Aa. carotides communes. Mit Durchtrennen der Ligaturen nach 15-minütiger Ischämie wurde die Reperfusion des Gehirns eingeleitet.

Für die Präparation des Schädelfensters wurde der Kopf des in Bauchlage befindlichen Versuchstiers, nach Oberflächenanästhesie der äußeren Gehörgänge mit Gingicain (Hoechst, Frankfurt), in eine stereotaktische Halterung (Model 900, Kopf Instruments, USA) eingespannt. Die Kopfhaut über der Schädelkalotte wurde durch einen 2,5 cm langen Medianschnitt eröffnet, durch Haltenähte (Perma-Hand-Seide 4-0, Ethicon, Norderstedt)

beiseite gedrängt und das darunterliegende Periost abgelöst. Mit einem stufenlos steuerbaren Handbohrer (Rewatronik, München) mit konischem Rosenbohrereinsatz von 0,75 mm Durchmesser (Fäger Sup-Dent, München) wurde unter Kühlung mit 0,9% Kochsalzlösung ein etwa 4 x 4 mm großes Fenster der parietalen Schädelschuppe trepaniert. Um die Integrität der Dura mater zu schützen, blieb eine dünne Knochenlamelle erhalten. Anschließend konnte, unter starker Vergrößerung des Operationsmikroskopes (25-fach), die Spitze einer feinen Pinzette (Aesculap, Tuttlingen) zwischen innere und äußere Kortikalis in spitzem Winkel eingebracht werden, um den Knochendeckel zu entfernen, ohne die Dura mater zu berühren bzw. zu verletzen. Das wegen der intakten Dura so bezeichnete *geschlossene Schädel Fenster* (Abb. 1) wurde kontinuierlich mit auf 37 C erwärmter 0,9 % Kochsalzlösung gespült, um ein Austrocknen der Dura zu verhindern.

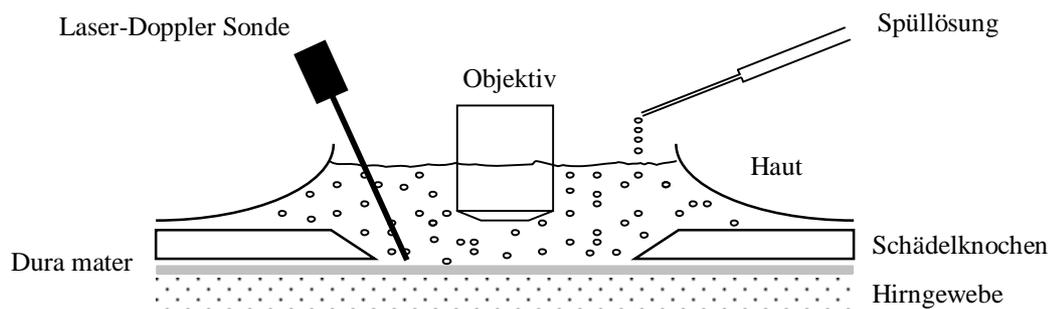


Abb. 1 Schematische Seitenansicht des Schädel Fensters mit geschlossener Dura mater

2.3 Laser-Doppler-Fluxmetrie

Die mikrovaskuläre Gewebepерfusion wurde per Laser-Doppler-Fluxmetrie quantifiziert (58;60;129). Änderungen der Durchblutung z. B. während Ischämie oder der postischämischen Phase werden damit kontinuierlich erfasst (72). Die Laser-Doppler-Fluxmetrie wurde zudem als Referenzmethode für die Bestimmung der Durchblutung per arteriovenöser Transitzeit eingesetzt. Als Laser-Doppler-Fluxmeter wurde das Gerät Typ MBF3D von Moor Instruments (England) verwendet (λ : 780-820 nm; 3 mW). Dem Dopplerprinzip folgend werden von einer Strahlungsquelle emittierte elektromagnetische

Wellen (Laser-Licht) von bewegten Objekten (Blutzellen) unter Änderung der Frequenz reflektiert, von nicht bewegten Objekten hingegen ohne Änderung der Frequenz. Fließende Erythrozyten reflektieren das Laser-Licht deshalb mit einem Frequenzsprung, ruhende Gewebestandteile ohne Frequenzsprung. Die Größe des Frequenzsprungs ist von der relativen Geschwindigkeit des Objekts zur Strahlungsquelle abhängig. Sie lässt sich nach folgender Gleichung berechnen.

$$f' = f \cdot \sqrt{\frac{1 - v/c}{1 + v/c}}$$

Gleichung 1 Dopplersprung der Frequenz des reflektierten Lichts. f' = Frequenz des reflektierten Lichts; f = Frequenz des einstrahlenden Lichts; v = Geschwindigkeit des Objekts; c = Lichtgeschwindigkeit (81).

Bei Auflösung der Gleichung nach v (Objekt/Blutzellengeschwindigkeit) wird ersichtlich, dass diese Größe eine Funktion der mit dem System bestimmten Frequenzänderung ist. Über eine Glasfaseroptik (Fiberoptik-Sonde P1) wurde das Laserlicht zum Gewebe, das reflektierte Streulicht zu einem Photodetektor geleitet, der ein elektrisches Signal generierte. Die Sonde hatte einen äußeren Durchmesser von 0,81 mm; sie wurde mit einem Mikromanipulator auf der Dura mater plaziert (Abb. 2).

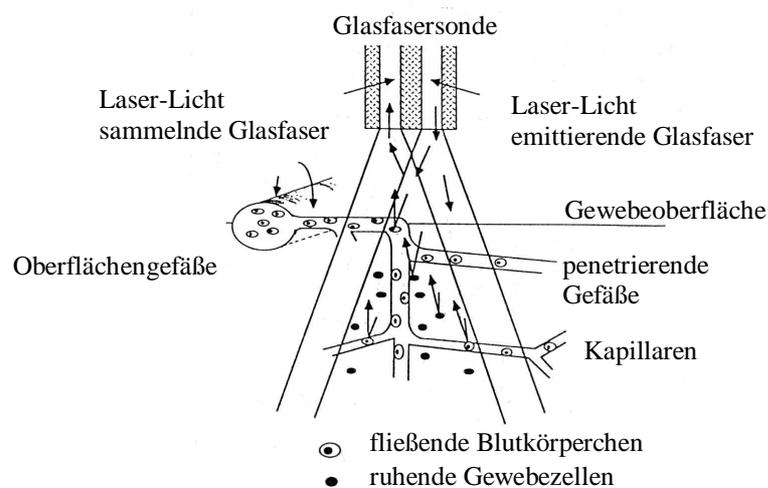


Abb. 2 Schematische Darstellung einer Laser-Doppler-Sonde, des Strahlengangs, der Hirnoberfläche und der kortikalen Mikrozirkulation nach Haberl (90).

Die Brechungswinkel des vom Gewebe reflektierten Streulichts und die Geschwindigkeiten der fließenden Zellen verteilen sich über ein Spektrum, dessen Bandbreite der mittleren Geschwindigkeit der Blutkörperchen proportional ist (28). Nur ein kleiner Teil der Streuung erfolgt durch bewegte Zellen, dadurch gibt die Amplitude des Spektrums Auskunft über den Volumenanteil der fließenden Zellen im Gewebe. Aufgrund dieser Gesetzmäßigkeit lassen sich die LDF-Parameter *Geschwindigkeit* und *Volumen* der bewegten Blutzellen als willkürliche Einheit definieren. Der Laser-Doppler-Flux wird aus dem Produkt der beiden Parameter errechnet:

$$\text{Flux} = \text{Volumen} * \text{Geschwindigkeit}$$

Das elektrische Signal des LDF-Photodetektors wurde von einem Analog- und Digitalprozessor weiterverarbeitet. Die Berechnung der drei Größen erfolgte mit einer Systemsoftware (Moorsoft, England), die Datenausgabe erfolgte wahlweise per Display oder Plotter. Der kortikale Flux (willkürliche Einheit, ohne Dimension) für die gewählten Messzeiten wurde unmittelbar nach der Intravitalmikroskopie ermittelt. Eine gleichzeitige Messung (LDF und Intravitalmikroskopie) war aufgrund der Überstrahlung der Hirnoberfläche durch das Laser-Licht nicht möglich.

2.4 Intravitalmikroskopie

2.4.1 Prinzip der Epiillumination

Fluoreszenz ist Licht, das nicht aufgrund einer Temperaturerhöhung der fluoreszierenden Substanz emittiert, sondern durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge erzeugt wird (91). Im Gegensatz zur Phosphoreszenz leuchtet Fluoreszenz nicht nach. Bei der Epiilluminationsmikroskopie (Abb. 3) wird ein fluoreszierender Indikator mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, das durch eine Lichtquelle erzeugt wird und ein Filter passieren muss. Zur Beobachtung der Fluoreszenzemission sind Sperrfilter in den Strahlengang eingebracht, die das Licht des Anregungsspektrums absorbieren oder reflektieren. Im Okular erscheint deshalb keine Erregungsstrahlung, während das Fluoreszenzlicht die Sperrfilter passiert. Durch die helle Emission des fluoreszierenden Indikators vor einem dunklen Hintergrund wird ein hoher Bildkontrast erreicht.

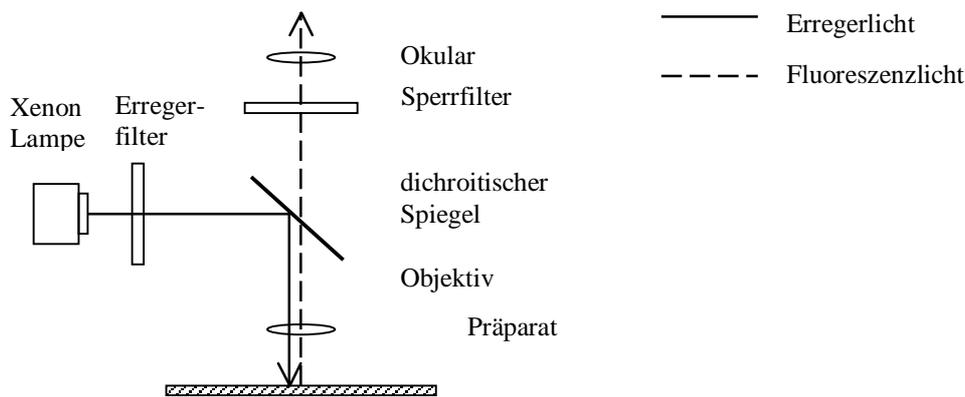


Abb. 3 Schema der Fluoreszenzmikroskopie mit Epiilluminationstechnik, nach Gerlach (80)

2.4.2 Aufbau des Intravitalmikroskops

Die Mikrozirkulation der Hirnoberfläche wurde mit Hilfe eines Orthoplan Epiilluminationsmikroskops (Leitz, Wetzlar) analysiert. Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz war auf einer pneumatisch gelagerten 300 kg schweren Granitplatte schwingungsfrei montiert. Mit einem Kugelgelenk (Effenberger, Pfaffingen) war der stereotaktische Halter mit dem Versuchstier fixiert, wodurch das Schädelfenster in der Horizontalen orientiert werden konnte. Pro Versuch wurden 3-4 Gefäßgebiete – *Regions of interest* (ROI) – der Hirnoberfläche in einem x-y-Koordinatensystem festgelegt und mit Hilfe eines Kreuztisches (Leitz, München) exakt reproduzierbar wiedergefunden. Das sekundenschnelle Wiederauffinden der gespeicherten ROIs zu den gewünschten Messzeitpunkten, somit die wiederholte Beobachtung identischer Gefäßabschnitte über den gesamten Versuchszeitraum wurde durch computergesteuerte Schrittmotoren (IXE.C, Phytron, Gröbenzell) gewährleistet. Als Anregungslichtquelle stand eine 75 W Xenon-Gasentladungslampe (XBO 75 W/2, Leitz, München) zur Verfügung bei einer Strahlungsleistung (in Prozent der Leistungsaufnahme) bei: $\lambda < 380$ nm von ca. 3 %, bei λ : 380 – 760 nm von ca. 15 % und bei $\lambda > 780$ nm von ca. 44 %. Das Licht passierte zunächst ein 7 mm Hitzefilter (Leitz, München), danach eine variable Irisblende, schließlich eine fest installierte Filterkombinationen. Die Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung Ploemopak (Leica, Wetzlar) ermöglichte dabei die Integration von aufeinander abgestimmten Erregerfilter, Reflexions-Kurzpassfilter und Sperrfilter in austauschbaren Filterblöcken. Durch eine

schnelle Schaltvorrichtung (Leitz, Wetzlar) zwischen den Filterblöcken N2, L3 und I2/3 (Tab. 1) konnten die mit unterschiedlichen Fluoreszenzindikatoren gefärbten Strukturen per Mehrwellenfluoreszenztechnik unter raschem Bildwechsel separat dargestellt werden.

Filterblock	Anregungsbereich	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
L3 (FITC)	Blau	BP 450-490 nm	RKP 510 nm	BP 525/20 nm
N2 (Rhodamin 6G)	Grün	BP 530-560 nm	RKP 580 nm	LP 580 nm
I2/3 (Na ⁺ -Fluoreszein)	Blau	BP 450-490 nm	RKP 510 nm	LP 515 nm

Tab. 1 Spektren der verwendeten Ploemopak-Filter. BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter, RKP: Reflexions-Kurzpassfilter, FITC: Fluoreszeinisothiocyanat

Das Salzwasserimmersionsobjektiv (25-fach, numerische Apertur: 0,6; Leitz, Wetzlar) konzentriert als Kondensor die Erregerstrahlung im Objektfeld und sammelt gleichzeitig das emittierte Fluoreszenzlicht. Ein 10-fach Objektiv mit der numerischen Apertur 0,22 erlaubte Übersichtsaufnahmen der Hirnoberfläche, z. B. zur Beurteilung der Integrität der Blut-Hirnschranke. Die durch die jeweils gefilterte Fluoreszenzemission sichtbaren Bildelemente konnten durch ein Okular (Periplan 10-fach; Leitz, Wetzlar) betrachtet werden oder direkt über einen C-Mount-Adapter von einer hochauflösenden Silikon-intensivierten Restlichtkamera (C2400-08, Hamamatsu Photonics, Japan), in einer Sensitivität von mindestens 50 $\mu\text{A}/\mu\text{W}$ im Spektrum von 400-650 nm, als Video aufgenommen werden. Zur Fokussierung war das Mikroskop mit Kamera an einem motorgesteuerten Spindeltrieb mit manueller Feinjustierung befestigt. Die online Darstellung der Bilder erfolgte durch einen Trinitron Monitor (Sony, Japan) in 930-facher Vergrößerung. Gleichzeitig wurden sie zur späteren Analyse der einzelnen intravitalmikroskopischen Szenen mit einem S-VHS Vidoerecorder (AG-7350, Panasonic, Japan) auf Videoband (KCA-60 BRS, Sony, Japan) in einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde aufgezeichnet. Ein Videotimer (VTG-33, FOR-A-Company Ltd., Japan) spielte Datum und Zeit (2/100 s-Schritte) ein.

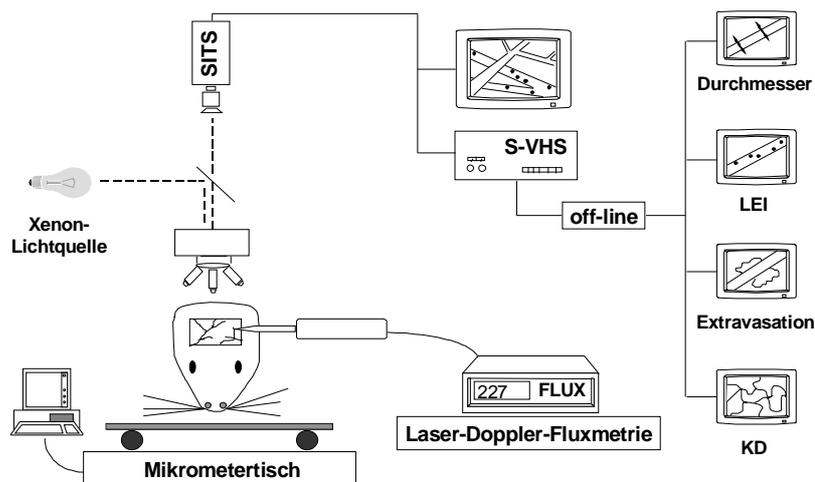


Abb. 4 Schema des Intravitalmikroskopischen Versuchaufbaus. LEI: Leukozyten-Endothelinteraktionen, KD: Kapillardichte, SITS: Silikon intensified target system (Lichtempfindliche Röhrenkamera)

2.4.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe (Tab. 2) wurden als Indikatoren eingesetzt, da Blutplasma, Endothelzellen, Blutzellen und insbesondere Leukozyten keine ausreichende Eigenfluoreszenz haben. Hochmolekulares, an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Dextran (durchschnittliches MG: 150.000 u; Sigma, Deisenhofen), gewährleistet eine Kontrastverstärkung von Plasma. Vor Beginn der intravitalmikroskopischen Beobachtungen wurde ein 0,25 ml-Bolus einmal intravenös injiziert. Aufgrund des Molekulargewichts von Dextran und anderer Eigenschaften kann der Indikator die intakte Blut-Hirnschranke nicht passieren (173).

Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt), ein positiv geladener, lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, mit einem Molekulargewicht von 479 u, färbt Mitochondrien sowie Kernstrukturen lebender Zellen (12;227) und eignet sich zur Sichtbarmachung von Leukozyten in Blutgefäßen. Für das Experiment wurde weiterhin die arterielle Anflutung, kapilläre Passage und venöse Auswaschung von Rhodamin 6G nach Bolusapplikation, d. h. die arteriovenöse Transitzeit und Kapillardichte, ermittelt. Vor den ersten Videoaufnahmen wurden 0,1 ml Rhodamin 6G (0,01%), danach zu jedem Messzeitpunkt des Protokolls, ein 25 µl-Bolus in die V. femoralis injiziert.

Na⁺-Fluoreszein (Merck, Darmstadt) hat ein Molekulargewicht von 376 u; es wurde i.v. als niedermolekularer Indikator zur Prüfung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke eingesetzt.

Fluoreszenz-Farbstoff	Konzentration	applizierte Menge	Gesamt-Dosis	Spektrum
FITC-Dextran	1%	0,3 ml	0,05 g/kg	A: 490 nm E: 525 nm
Rhodamin 6G	0,01%	0,4 ml	0,7 mg/kg	A: 540 nm E: 625 nm
Na ⁺ -Fluoreszein	0,1%	0,2 ml	3 mg/kg	A: 490 nm E: 525 nm

Tab. 2 Fluoreszenzfarbstoffe. Konzentration, Volumen, Dosierung und Wellenlängen der Absorptions- (A) und Emissionsmaxima (E)

Die Analyse der intravitalmikroskopischen Parameter der Mikrozirkulation erfolgte offline nach dem Versuch anhand der Aufzeichnungen mit S-VHS Videoband mit Hilfe eines Auswertesystems (Videorecorder: Panasonic, Japan; Monitor: Sony, Japan). Die unter Versuchsbedingungen aufgenommenen Mikrometerskalen (Leitz, Wetzlar) ermöglichten die Eichung der horizontalen und vertikalen Achse, somit die Ermittlung der tatsächlichen Vergrößerung auf dem Bildschirm (780-fach) der Auswerteeinheit.

2.4.4 Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser

Nach i. v. Injektion von FITC-Dextran wurden die Durchmesser von Arteriolen und postkapillären Venolen durch eine Schublehre mit Nonius-Skalierung im Videostandbild bestimmt (112). Dabei wurde die Distanz zwischen zwei gegenüberliegenden Punkten der Ränder der fluoreszierenden Plasma-Säule bestimmt, die zur exakten Identifikation in den folgenden Aufnahmen in einer Skizze des Gefäßbetts markiert waren. Mit dieser Methode wurden Kaliberschwankungen von 2-3 µm erfasst. Es wurden Arteriolen mit einem Durchmesser von 20-90 µm und Venolen mit einem Durchmesser von 20-60 µm ausgewertet.

2.4.5 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Leukozyten-Endothelinteraktionen wurden quantitativ erfasst. Nach der Aufzeichnung von 3-4 ROIs über 30 s, die eine oder mehrere Venolen von 20-60 μm Durchmesser enthielten, wurden folgende Parameter bestimmt:

Roller: Anzahl der am Endothel entlang-rollenden Leukozyten.

Roller waren Leukozyten, die an der inneren Gefäßwand mit mindestens einer Änderung ihrer Geschwindigkeit entlang-rollten. Aufgrund der hohen Fließgeschwindigkeiten von weißen Blutkörperchen war deren Messung in den zerebralen Venolen, einschließlich Zählung, nicht durchführbar, auch nicht durch Einzelbildanalyse. Die bei der Intravitalmikroskopie anderer Organe übliche Definition (121;133;230) von *Rollern* als Leukozyten, die deutlich langsamer als der Zentralstrom fließen, einschließlich ihrer Angabe in Prozent aller fließender Leukozyten, war somit nicht möglich.

Sticker: Anzahl der am Endothel fest adhärenen Leukozyten

Sticker waren Leukozyten, die der Gefäßinnenwand > 20 s ohne Positionsänderung anhafteten.

Die Auszählung von Rollern und Stickern erfolgte in identischen Gefäßsegmenten von 100 μm Länge. Das Ergebnis ist als Zahl [n] von Leukozyten pro Gefäßabschnitt und Zeiteinheit wiedergegeben [$n/100 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$].

2.4.6 Kapillardichte

Mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg (243)) war es möglich, Kapillaren mit einem Maus-gesteuerten Cursor durch Nachfahren zu markieren und deren Dichte als gesamte Länge pro Beobachtungsfeld in cm/cm^2 zu berechnen. Die Qualität der Abbildung der Mikrogefäße im geschlossenen Schädelfenster reichte jedoch nicht aus, um zu entscheiden, ob eine Kapillare von Erythrozyten durchströmt wurde oder, ob eine stehende Plasmasäule für den Gefäßkontrast verantwortlich war. Die Bestimmung der *funktionellen Kapillardichte* (FKD), definiert als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Fläche war somit nicht möglich. Stattdessen wurde bei jeder Aufnahme ein 25 μl Rhodamin 6G-Bolus intravenös appliziert und die *Kapillardichte* (KD) erhoben, als Länge der mit Plasma (Rhodamin 6G) perfundierten Kapillaren pro Fläche.

2.4.7 Integrität der Blut-Hirnschranke (BHS)

Am Ende des Versuchs wurde den Tieren 0,2 ml Na⁺-Fluoreszein (Sigma, Deisenhofen) intravenös infundiert. Nach 20 Minuten Zirkulationszeit konnte die Integrität der Blut-Hirnschranke in der Übersichtsvergrößerung (10-fach Objektiv, numerische Apertur: 0,22; Leitz, Wetzlar) geprüft werden. Dieser Farbstoff ist bei intakter Schranke streng intravasal lokalisiert, weist hingegen bei Anfärbung von Hirnparenchym auf eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke hin.

2.4.8 Arteriovenöse Transitzeit

Als Maß der regionalen Durchblutung wurde die arteriovenöse Transitzeit (AVTT) bestimmt. Darunter versteht man die Zeit t , die ein intravenös verabreichter Farbstoffbolus benötigt, um vom arteriellen in den venösen Abschnitt des Gefäßbaums zu gelangen. Diese Zeit t ist umgekehrt proportional zur Durchblutung Q und eignet sich somit als Messgröße der lokalen Gewebedurchblutung (s. Abb 5, Formel 2 und 3).

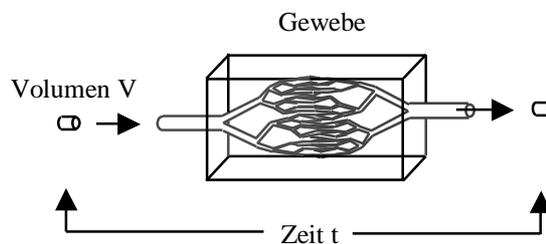


Abb. 5 Konzept der arteriovenösen Transitzeit (AVTT) als Parameter der regionalen Durchblutung

$$\text{Durchblutung } Q = \frac{\text{Volumen } V}{\text{Zeit } t}$$

$$\text{Durchblutung } Q \sim \frac{1}{\text{AVTT}}$$

Formel 2 und 3 Gleichungen zur Ermittlung der Gewebedurchblutung (238) durch Bestimmung der arteriovenösen Transitzeit

Für die Messung der AVTT wurde ein 25 µl Rhodamin 6G-Bolus intravenös appliziert. Der von der Hirnoberfläche intravitalmikroskopisch beobachtete arteriovenöse Farbstoffübergang wurde auf Videoband aufgezeichnet. Für die Analyse der AVTT wurde diese Bildsequenz mit einem Bildverarbeitungssystem (IBAS 2.0; Kontron, Eching) digitalisiert. Ein jeweils für eine benachbarte Arteriole und Venole (30-50 µm) definiertes Messfenster erlaubte die Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten $I(t)$ (256 mögliche Graustufen) als Funktion der Zeit t (s. Abb. 6). Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz $I_0 = I(t = 0)$ ist die Ausgangsfluoreszenz gleich Null:

$$\hat{I}(t) = I(t) - I_0 \quad (1)$$

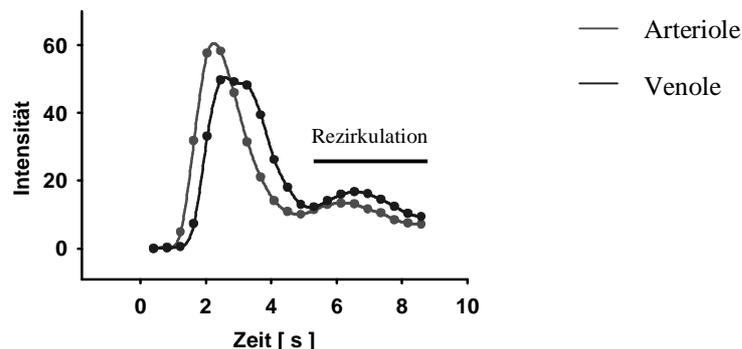


Abb. 6 Diagramm der gemessenen Fluoreszenzintensitäten (in willkürlicher Einheit) über die Zeit nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz. Dargestellt ist der Farbstoffübergang eines intravenösen Bolus des Fluoreszentindikators vom arteriellen ins venöse Gefäßsystem. Hellgrau sind die im arteriellen, dunkelgrau die im venösen Meßfenster ermittelten Intensitäten. Etwa nach 5 s setzt die Rezirkulation des Farbstoffes, symbolisiert durch den horizontalen Balken, ein.

Eine von Rovainen et al. 1993 (186) vorgeschlagene Integral-Differenz-Methode wurde zur Berechnung von AVTT verwendet, basierend auf der Verzögerung der Kinetik der arteriellen und venösen Integrale der Fluoreszenzintensitäten. Um die bereits vor vollständiger Auswaschung des Farbstoffs einsetzende Rezirkulation als Störfaktor zu eliminieren, wurden einige Rechenschritte durchgeführt:

- Unter Annahme einer exponentiellen Auswaschung des Farbstoffs ist der initiale Abfall der logarithmierten Fluoreszenzintensität linear (Abb. 7). Eine bereits vor vollständiger Auswaschung einsetzende Rezirkulation manifestiert sich dadurch als Abweichung vom linearen Abfall, d. h. als erneuter Anstieg der Intensität. Um diese Abweichung durch den erneuten Intensitätsanstieg, also den Einfluss der Rezirkulation zu eliminieren, wurde der initiale lineare Abfall extrapoliert (Abb. 8).

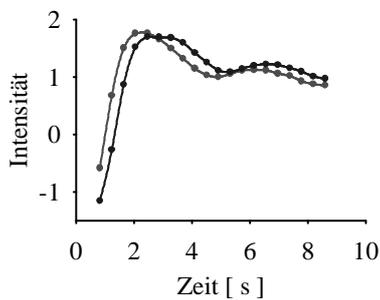


Abb. 7 Darstellung der Messwerte von Abb. 6 nach Logarithmierung der Intensitäten

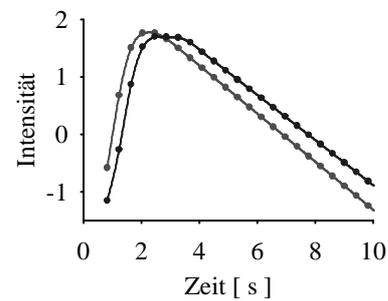


Abb. 8 Darstellung der Messwerte von Abb. 7 nach Extrapolation des initialen linearen Abfalls der Fluoreszenzintensitäten

- Die Exponentenbildung der berechneten Daten ergibt eine Fluoreszenzintensität $\tilde{I}(t)$ mit Kinetik ohne Rezirkulation des Fluoreszenzindikators (Abb. 9).

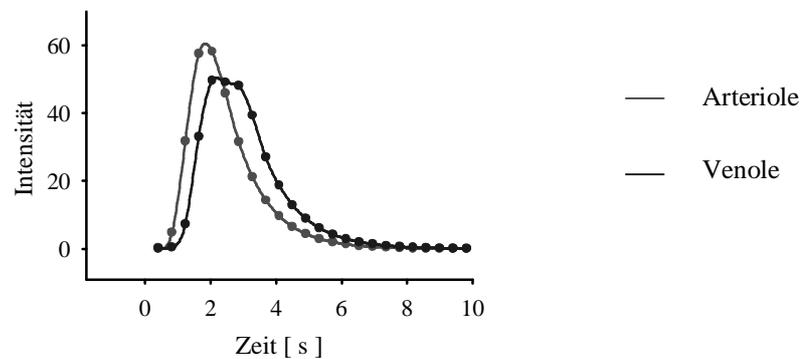


Abb. 9 Kinetik der Fluoreszenzintensität \tilde{I} nach rechnerischer Elimination (Exponentialfunktion von Abb. 8) der Rezirkulation

- Nach dem Vorschlag von Rovainen und Mitarbeitern (186) entspricht die arteriovenöse Transitzeit dem Integral der Differenz zwischen dem arteriellen (A) und venösen (V) Summenintegral der Fluoreszenzintensitäten \tilde{I} ; es kann somit nach folgender Formel berechnet werden:

$$AVTT = \int_0^{\infty} \left(\frac{1}{\int_0^{\infty} \tilde{I}_A(t') dt} \cdot \int_0^t \tilde{I}_A(t') dt' - \frac{1}{\int_0^{\infty} \tilde{I}_V(t') dt} \cdot \int_0^t \tilde{I}_V(t') dt' \right) dt''$$

Formel 4 Berechnung der arteriovenösen Transitzeit (AVTT) aus dem Integral der Differenz zwischen dem arteriellen und venösen Summenintegral der Fluoreszenzintensitäten nach der Integral-Differenz Methode von Rovainen. \tilde{I} = Fluoreszenzintensität, A = arterielles Meßfenster, V = venöses Messfenster, t = Zeit

Der Kehrwert der arteriovenösen Transitzeit AVTT ist das Maß von relativen Änderungen der Durchblutung im Vergleich zu dem in der präischämischen Kontrollphase erhobenen Ausgangswert. Um die als AVTT und mit LDF erhobenen Werte der Durchblutung vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse miteinander korreliert.

2.5 Körpergewicht

Das Körpergewicht als prognostischer Faktor bei der globalen zerebralen Ischämie von Gerbils (212) wurde täglich bestimmt (Ohaus LS 2000; Ohaus, USA).

2.6 Neurologische Untersuchung

Das postischämische Verhalten und neurologische Defizit der Tiere wurde unter Verwendung eines Testprotokolls quantifiziert. Die Prüfung erfolgte mit einem von Bures et al. (33) für Ratten entwickelten, inzwischen (35;223;226) veränderten Neuroscore, der sich auch für Mongolische Wüstenrennmäuse (148;202) eignet. Die Prüfung des neurologischen Status beinhaltet folgende Punkte (Tab. 3):

Gleichgewicht: Platzierung des Tieres auf einer 30° geneigten Ebene mit Kopf-Hochlagerung; die normale Reaktion ist Drehen des Körpers und nach unten Laufen.

Greifreflexe: Nach Bestreichen der Pfoten mit einem Holzstäbchen wird dieses umgriffen. *Ausrichtreflexe*: Bei Drehen des Rückens in eine Richtung bewegt sich der Kopf in die andere; wird das Tier auf den Rücken gelegt, dreht es sich sofort auf die Füße. Bei Annäherung des am Schwanz gehaltenen Gerbils an eine Unterlage werden beide Vorderpfoten ausgestreckt. *Kornealreflex*: Lidschluss nach Berührung der Kornea mit einem Wattebausch. *Pinnareflex*: Kopfschütteln nach Bestreichen des Ohrs. *Spontanmotilität*: keine Bewegungspausen von >30 s beim wachen Tier. *Circling*: Laufen im Kreis. *Haltung*: keine Flexion der Vorderpfote oder Verdrehung des Thorax wenn das Versuchstier am Schwanz gehalten wird. Das Zernagen von Pappestückchen wurde zusätzlich bewertet.

Für die einzelnen Verhaltensweisen bzw. das Bewältigen von Aufgaben wurden Punkte (Tab. 3) vergeben. Der normale Ausgangswert der Tiere vor Ischämie war 21 Punkte, nach Ischämie erreichten die Tiere aufgrund von Ausfällen eine niedrigere Punktezahl.

Aufgabe	normale Punktzahl	gesamt	Defizit
schiefe Ebene	2 (<15 s)	2	1 (15-30 s) 0 (>30 s)
Greifreflex	1 (pro Pfote)	4	0
Kopf drehen	1 (pro Seite)	2	0
Umdrehen aus Rückenlage	1	1	0
Fallreflex	1	1	0
Kornealreflex [1 pro Seite]	1 (pro Auge)	2	0
Pinnareflex [1 pro Seite]	1 (pro Ohr)	2	0
spontane Motilität	2 (Pausen <30s)	2	1 (Pausen) 0 (keine Bewegung)
Circling	2 (fehlt)	2	1 (am Schwanz gehalten) 0 (spontan)
Flexion der Vorderpfote	1 (fehlt)	1	0
Verdrehung des Thorax	1 (fehlt)	1	0
Knabbern	1	1	0
9	Gesamtpunktzahl	21	

Tab. 3 *Punkteskala zur Bewertung von Verhalten und neurologischem Defizit*

2.7 Histologie

Um den ischämischen Parenchymschaden (47;104;130) zu quantifizieren wurde das Gehirn der Versuchstiere histomorphometrisch analysiert.

Am vierten Tag nach Ischämie wurden die Tiere in tiefer Äthernarkose (ASID Bonz, Böblingen) thorakotomiert und mit Phosphat-gepufferter (pH 7,4) 4%-Paraformaldehydlösung (40) perfusionsfixiert. Für diesen Zweck wurde der linke Herzventrikel durch den Apex cordis mit einer stumpfen 20 G Einmalkanüle (Braun, Melsungen) punktiert. Anschließend wurde das Herzohr des rechten Vorhofs eröffnet. Das Gefäßsystem wurde zunächst mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung mit einem Perfusionsdruck von 100 cm H₂O gespült, bis die aus dem rechten Herzen austretende Flüssigkeit klar war. Anschließend wurde 15 min lang Paraformaldehydlösung zur Perfusionsfixation infundiert. Nach Entfernen der Kalotte mit einer Knochenzange und Eröffnen der Dura mater wurden der kaudale Hirnstamm und die Nervus olfactorii und optici durchtrennt, das Gehirn entnommen und in Paraformaldehydlösung (4%) eingelegt.

Nach 24 Stunden oder später wurde das fixierte Gehirn mit einer Alkoholreihe steigender Konzentration entwässert. Zur Entfernung des Alkohols wurde das Gehirn anschließend in Methylsalicylat und Xylol (Merck, Darmstadt) suspendiert. Die mit Paraplast-plus (Monoject Scientific, Athy, Ireland) eingebetteten Präparate wurden mit einem Rotationsmikrotom in der Koronar-Ebene seriell geschnitten (5 µm Schichtdicke), auf einem beschichteten Objektträger (SuperFrost, Menzel, Braunschweig) aufgetragen und nach Nissl (164) mit Kresylviolett (Merck, Darmstadt) gefärbt.

2.8 Quantitative Histomorphometrie

Zur quantitativen Erfassung des selektiven Zelluntergangs wurden die Nervenzellen morphologisch als vital oder avital differenziert.

In Anlehnung an lichtmikroskopische Untersuchungen von Eke und Conger (65) und Garcia (77) galten hierfür die in Tab. 4 angegebenen Entscheidungskriterien.

Scharf begrenzter, runder oder ellipsoider Zellkern
Ein oder mehrere, deutlich erkennbare(r) Nucleolus/Nucleoli innerhalb des Zellkerns
Nur geringgradige Helligkeitsunterschiede zwischen Zellkern und Neuropil
Abgrenzbarkeit des Zytoplasmas vom umliegenden Neuropil
Weniger als ein Drittel des Neurons von konfluierenden Vakuolen umgeben

Tab 4 *Histologische Merkmale für vitale Nervenzellen (212). Nur Neurone, die alle gelisteten Kriterien erfüllten, wurden als vital klassifiziert.*

Die histologische Bewertung wurde mit einem Durchlichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 10-facher Okular- und Objektivvergrößerung vorgenommen. Eine CCD-Videokamera (Sony, Japan) war über einen C-Mount-Adapter an das Mikroskop und mit einem Interface an einen IBM-kompatiblen PC (PPC, Schadt, München) angeschlossen. Die histologischen Schnitte konnten dadurch mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Optimate (BioScan, USA) auf einem Computermonitor (Phillips, Niederlande) in einer Auflösung von 750 x 512 Pixeln mit 256 Graustufen dargestellt werden. Das Bildverarbeitungssystem ermöglichte außerdem das Auszählen von per Mausclick markierten Neuronen. Die Zuordnung von Nervenzellen (Beispiel Abb. 10) als vital oder avital erfolgte am Bildschirm. Durch Einblendung eines Rahmens wurde die Nervenzeldichte auf ein damit festgelegtes Gewebeareal bezogen.

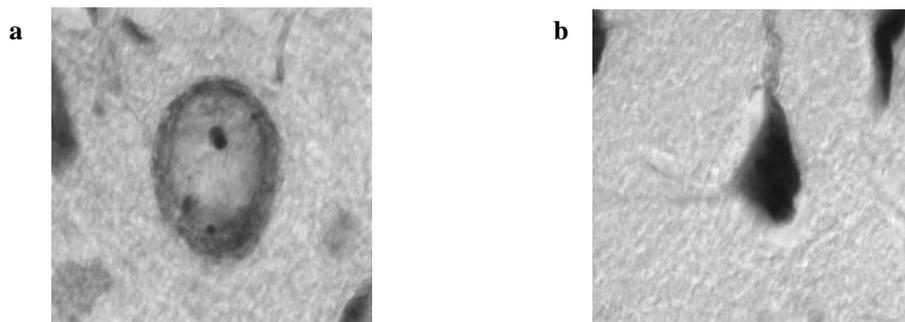


Abb. 10 (a) Beispiel eines als vital klassifizierten Neurons eines scheinoperierten Kontrolltiers ohne Ischämie und (b) eines Neurons eines Tieres vier Tage nach globaler zerebraler Ischämie mit den morphologische Zeichen einer irreversiblen Zellschädigung (Chromatinverdichtung, Schrumpfung, Auflösung der subzellulären Strukturen, perizelluläre Vakuolisierung)

Die Bestimmung der Dichte vitaler Nervenzellen im dorsalen Hippocampus, Striatum, sowie frontalen und parietalen Kortex erfolgte in Anlehnung an eine von Stummer et al. (214) beschriebene Methode. Der hierfür verwendete *Stereotactic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain* (143) ermöglichte die anatomische Orientierung und Zuordnung von dorsalem und ventralem Hippocampus, Ventrikelsystem und Corpus callosum, das Auffinden von histologischen Referenzschnitten in 0,5 mm rostraler oder 1,7 mm kaudaler Entfernung vom Bregma als Bezugspunkt. Der rostrale histologische Schnitt enthielt frontalen Kortex und

Striatum, der kaudale histologische Schnitt parietalen Kortex und dorsalen Hippocampus. Um die jeweils identischen Areale für die Auswertung der histologischen Präparate zu finden, wurden ebenfalls neuroanatomische Strukturen als Orientierung verwendet. Im dorsalen Hippocampus wurden die vitalen Neurone eines Ausschnitts der CA1, CA2, CA3 und CA3/4 Region des Cornu Ammonis (141) ausgezählt. Abb. 11 zeigt Lage, Tab. 5 Größe der Messfenster.

Die Nervenzelldichte im Striatum wurde histomorphometrisch in der Mitte zwischen Seitenventrikel und Radiatio corporis callosi bestimmt (Abb. 11, Tab. 5).

Die histologische Differenzierung des Neokortex in sechs Schichten war nach Ischämie nicht mehr zuverlässig möglich. Um seinem laminären Aufbau dennoch Rechnung zu tragen, wurden vom Interhemisphärenspalt ausgehend über seine Ausdehnung von Hirnoberfläche bis Marklager vier gleich große Messfenster im Abstand von drei Millimetern gelegt (Abb. 11, Tab. 5).

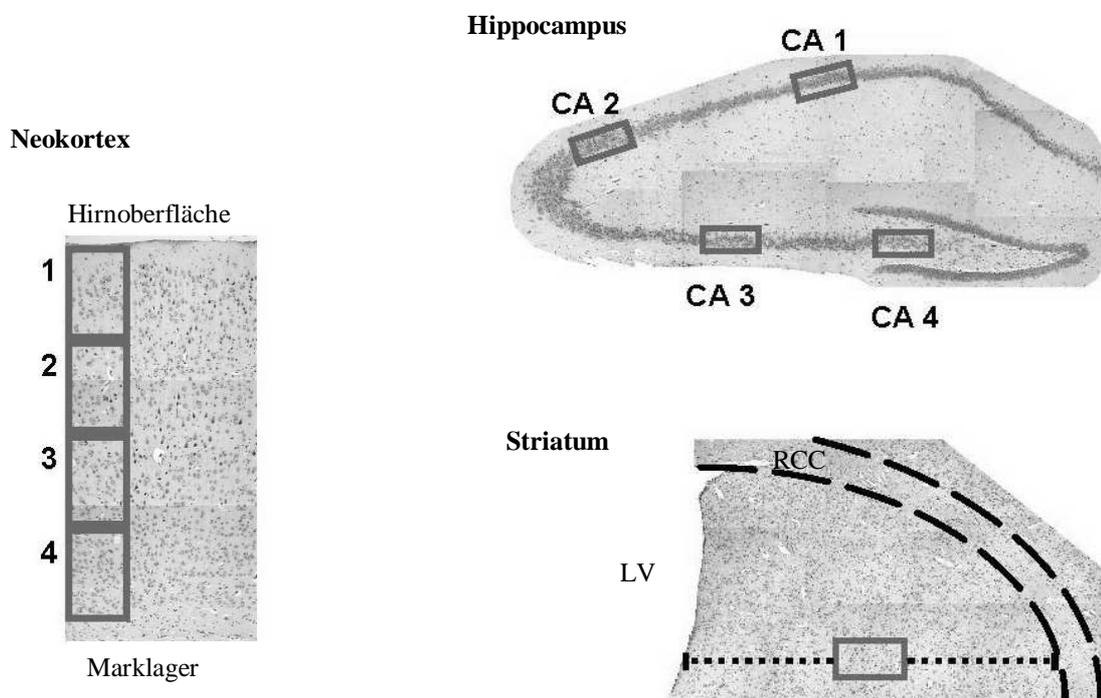


Abb. 11 Lage der Messfenster (hellgrau) für die histomorphometrische Auswertung im Neokortex, Hippocampus und Striatum. CA: Cornu ammonis, RCC: Radiatio corporis callosi, LV: lateraler Ventrikel

Areal	Größe des Messfensters [mm]
CA 1	0,325 x 0,14
CA 2	0,325 x 0,14
CA 3	0,325 x 0,14
CA 4	0,325 x 0,14
Striatum	0,255 x 0,325
frontaler Neokortex	($\frac{1}{4}$ x Kortexbreite) x 0,2
frontoparietaler Neokortex	($\frac{1}{4}$ x Kortexbreite) x 0,2

Tab. 5 Geometrische Dimensionen der Messfenster für die histomorphometrische Auswertung von vitalen Neuronen. CA: Cornu ammonis

Die Zahl der vitalen Neurone von jedem Versuchstier ging als Mittelwert beider Hirnhemisphären in die statistische Auswertung ein. Zudem wurden alle histologischen Schnitte in der Übersichtsvergrößerung nach Mikroinfarkten abgesucht.

2.9 Histochemischer Nachweis von neutrophilen Granulozyten durch Esterasefärbung

Die Intravitalmikroskopie der Hirnoberfläche mit Epiillumination zur Analyse der Mikrozirkulation hat eine maximale Eindringtiefe von ca. 70 μm . Nicht in dieser oberflächlichen Gewebeschicht mit dem Gefäßendothel interagierende Leukozyten entgehen deshalb der Beobachtung. Zur Erfassung auch solcher Zellen wurden Ischämieversuche bei drei weiteren Tieren durchgeführt, die im Anschluss an die übliche intravitalmikroskopische Beobachtungsphase perfusionsfixiert worden sind und deren Gehirn ebenfalls seriell geschnitten wurde (siehe oben). Zur histologischen Sichtbarmachung von Granulozyten im Hirnparenchym wurde die Naphthol AS-D Chloracetat-Eserase Färbung (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Bei dieser zytochemischen Methode hydrolysiert eine spezifische Granulozytenesterase (34;64;152;155) die Esterbindungen von Naphthol AS-D Chloracetat und setzt Naphthol frei. In Anwesenheit von Diazoniumsalz wird damit ein rot-violetter Farbniederschlag am Ort der Leukozytenesterase gebildet. Damit gefärbte Granulozyten sind mit hohem Kontrast histologisch erkennbar.

2.10 Versuchsgruppen und Protokolle

In der vorliegenden Arbeit sind Veränderungen der Mikrozirkulation des Gehirns bei der globalen zerebralen Ischämie erfasst worden. Um Aussagen über deren Kinetik treffen zu können, hatten die intravitalmikroskopischen Beobachtungen der Reperfusionphase eine Dauer von drei Stunden; in einer weiteren Gruppe wurden Tiere bis zu sieben Stunden nach Ischämie untersucht. Im Anschluss an den Akutversuch wurden die Tiere täglich beobachtet und gewogen bis zur Perfusionsfixation des Gehirns nach vier Tagen (Abb. 12).

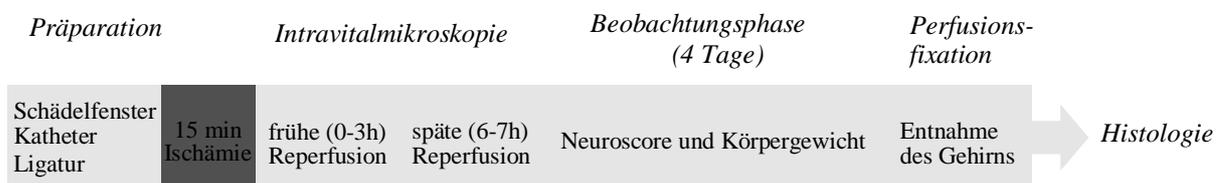


Abb. 12 Schematisches Protokoll der Studie. Nach Präparation und Ischämie wird die zerebrale Mikrozirkulation zunächst drei Stunden, in einer weiteren Gruppe 6 und 7 Stunden lang beobachtet. Die gleichen Versuchstiere wurden neurologisch untersucht, gewogen und nach Perfusionsfixation des Gehirns am vierten Tag histomorphometrisch analysiert.

2.10.1 Frühe Reperfusion – Analyse der Mikrozirkulation bis 3 Stunden nach Ischämie

Zur Etablierung des Modells mit Analyse der zerebralen Mikrozirkulation bis zu drei Stunden nach Ischämie wurden 8 Tiere untersucht. Zehn scheinoperierte Tiere mit Umschlingen jedoch ohne Unterbindung der Aa. carotides communes haben die dazugehörige Kontrollgruppe repräsentiert. Die chirurgische Präparation der Versuchstiere dauerte etwa 90 min. Nach Videokontrollaufnahmen und der folgenden 15-minütigen Ischämiephase wurden die oben angegebenen intravitalmikroskopischen Parameter der Mikrozirkulation in der Reperusionsphase zu den im Protokoll angegebenen Zeiten für eine Dauer von drei Stunden erhoben. Die Belichtung der Hirnoberfläche mit L3-gemindertem Anregungslicht für die Durchmesserbestimmung der Blutgefäße dauerte 5 s, mit N2-gemindertem Licht (LEI, KD, AVTT) jeweils 30 s für jede Aufnahmeperiode.

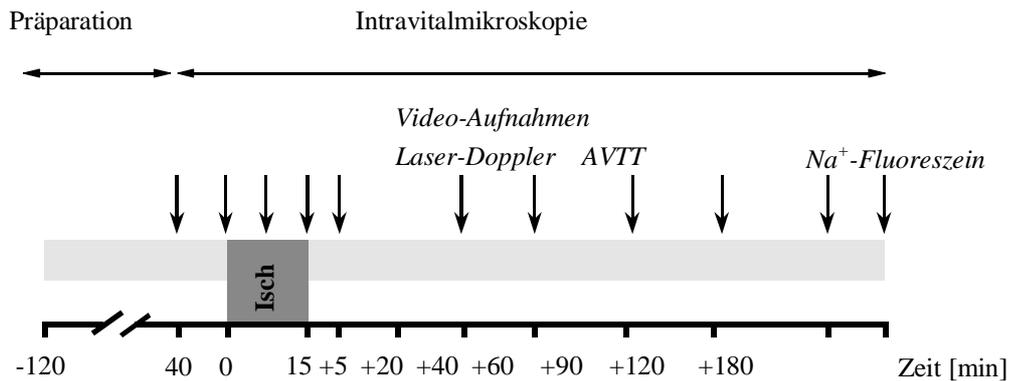


Abb. 13 Protokoll der frühen Reperfusionphase zur Bestimmung der regionalen Hirndurchblutung mit Hilfe von LDF und arteriovenöser Transitzeit. Drei Stunden nach dem Insult erfolgte die Infusion von Na^+ -Fluoreszein zur Analyse der Blut-Hirnschrankenpermeabilität.

2.10.2 Späte Reperfusion – Analyse der Mikrozirkulation 6 und 7 Stunden nach Ischämie

In dieser Gruppe waren die Versuchstiere (n=6) zunächst nur für die Dauer der Ischämiephase narkotisiert, danach erwachten sie wieder. Vier Stunden später wurden sie zur Präparation des Schädelfensters mit Intravitalmikroskopie erneut narkotisiert. Eine Kontrollgruppe (ohne Ischämie) von fünf Versuchstieren wurde ebenso behandelt. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden 6 und 7 Stunden nach Ischämie durchgeführt.

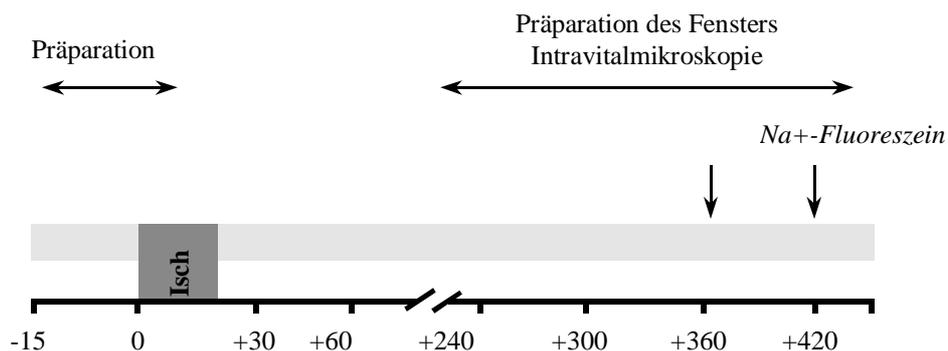


Abb. 14 Versuchsablauf zur Analyse der späten Reperfusionphase. Pfeile symbolisieren die Zeit der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen. Nach Präparation und Ischämie erwachten die Tiere vorübergehend. Für die Intravitalmikroskopie in der späten Reperfusionphase wurden sie erneut narkotisiert.

Für die Bestimmung von Körpergewicht, Neuroscore und Histomorphometrie wurden jeweils 6 Tiere (Ischämie- und Kontrollgruppe) verwendet.

2.11 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit einem Personalcomputer (Digital, Personal Workstation 200; USA) unter Verwendung des SigmaStat-Programms (Version 2.0, Jandel Scientific; USA) statistisch ausgewertet. Nach Prüfen auf Normalverteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnov-Test wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe parametrischer oder nicht-parametrischer Tests auf Signifikanz analysiert. Für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test eingesetzt; lagen nur zwei Gruppen vor so wurde der Friedman- und Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei normalverteilten Ergebnissen wurden aufgrund der geringen n-Zahl nicht-parametrische Testverfahren angewendet. Zur Prüfung, ob eine statistische Korrelation zwischen der Anzahl überlebender Neurone und der Anzahl rollender bzw. adhärenter Leukozyten und dem funktionellen Outcome besteht, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman errechnet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 5\%$ zur Ablehnung der Nullhypothese festgelegt. Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Ergebnisse

3.1 Kontrollparameter

3.1.1 Makrohämodynamik

Der arterielle Mitteldruck (MAD) der Kontroll- und Ischämiegruppe war in der Ausgangsphase mit 77 ± 6 mmHg und 77 ± 11 mmHg nahezu identisch. Während der Karotisokklusion stieg der Blutdruck in der Ischämiegruppe signifikant an, kehrte jedoch unmittelbar nach Beendigung der Ischämie wieder auf den Ausgangswert zurück. Im weiteren Verlauf blieb der Blutdruck konstant (Abb. 15). Bei den Kontrolltieren blieb der Blutdruck während des gesamten Versuchs unverändert.

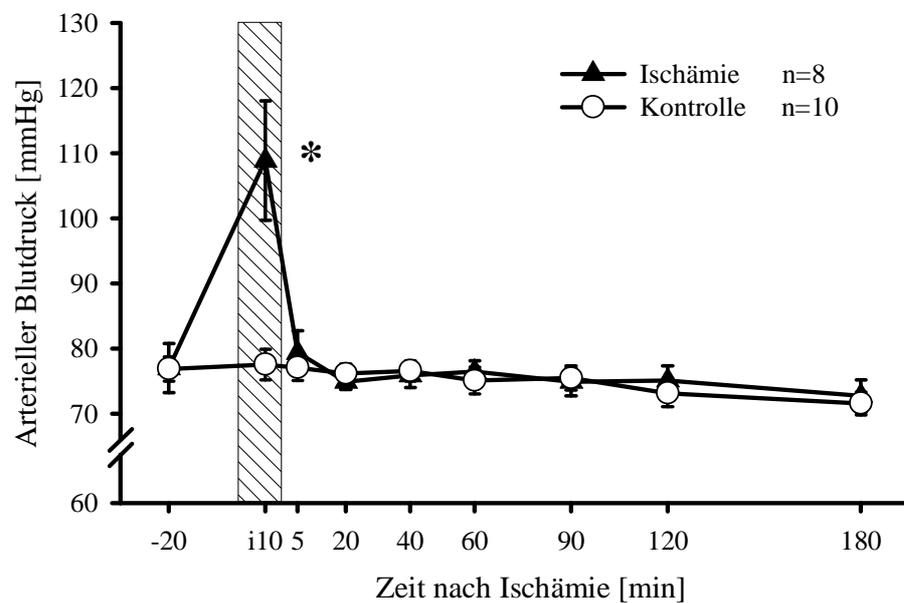


Abb. 15 Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks vor, während und nach der globalen zerebralen Ischämie. Versuchstiere mit Ischämie hatten während der Karotisokklusion einen signifikanten Blutdruckanstieg. Mit Beginn der Reperfusion war der Blutdruck von beiden Versuchsgruppen nicht mehr verschieden, sondern blieb bis zum Ende der Beobachtungsphase (3 Stunden nach Ischämie) konstant. * $p < 0,05$ (Friedman- und Mann-Whitney-U-Test). Der schraffierte Balken symbolisiert die Ischämiephase.

3.1.2 Blutgase, Blutzucker, Hämatokrit und Leukozyten im peripheren Blut

Aufgrund des geringen Blutvolumens (ca. 5 ml) der 60-80 g Versuchstiere waren mehrfache Blutentnahmen während des Versuchs nicht möglich. Deshalb wurden Blutgasanalysen in 5 separaten Akutversuchen, ohne Wiederaufwachen der Tiere, durchgeführt (Tab. 6). Nach 5 Stunden Halothan-Maskennarkose waren alle Tiere azidotisch (pH: $7,24 \pm 0,01$); während der arterielle pO_2 und pCO_2 unverändert blieben.

	Versuchsbeginn	Versuchsende (+300min)
p_aO_2 [mmHg]	231 ± 20	209 ± 62
p_aCO_2 [mmHg]	$41,7 \pm 1,4$	$40,1 \pm 2,9$
pH	$7,38 \pm 0,017$	$7,24 \pm 0,014^*$
Hämoglobin [mg/dl]	$12,3 \pm 0,25$	$10,6 \pm 0,56^*$
Leukozyten [$10^9/l$]	$10,0 \pm 1,7$	$19,1 \pm 2,2^*$

Tab. 6 Arterielle Blutgase, pH, Hämoglobin und Leukozytenzahl von 5 Kontrolltieren zu Versuchsbeginn und nach 5 Stunden Halothan-Maskennarkose; * $p < 0,05$ (Student t-Test).

Der Hämoglobingehalt fiel von 12,3 g/dl zu Versuchsbeginn auf 10,6 g/dl am Versuchsende ab (Tab. 6).

Die Leukozytenzahl im peripheren Blut wurde sofort nach Implantation des Venenkatheters, sowie am Versuchsende bestimmt. Bei den Kontrolltieren ohne Ischämie kam es im Vergleich zum Ausgangswert zu einer signifikanten Erhöhung (Tab. 6).

Bei den ersten Versuchen (7 Kontrolltiere, 5 Tiere mit Ischämie) wurde der Blutzuckerspiegel zu Beginn gemessen. Sofort nach Implantation des venösen Katheters wurde ein Blutzucker-Schnelltest durchgeführt. Die Glukosespiegel von 5 Gerbils mit globaler zerebraler Ischämie und 7 Kontrolltieren unterschieden sich nicht signifikant (Tab. 7).

	Ischämie (n=5)	Kontrolle (n=7)
Blutzucker [mg/dl]	93 ± 10	98 ± 6

Tab. 7 Blutzuckerausgangswert zu Versuchsbeginn von Tieren mit und ohne Ischämie. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.2 Zielparameter

3.2.1 Gefäßdurchmesser

In der Stabilisierungsphase der ersten 40 min wurden mit Intravitalmikroskopie keine Unterschiede zwischen den arteriellen Gefäßdurchmessern (Abb. 16) der Ischämie- und scheinoperierten Kontrollgruppe gefunden. Bei den Kontrolltieren blieb die Gefäßweite von Arteriolen über den gesamten Beobachtungszeitraum unverändert. Mit Absinken der Durchblutung in der Ischämiephase nahm der Arterioldurchmesser gegenüber den Arteriolen von Tieren der Kontrollgruppe signifikant ab, kehrte allerdings nach Ischämie auf den Ausgangswert zurück.

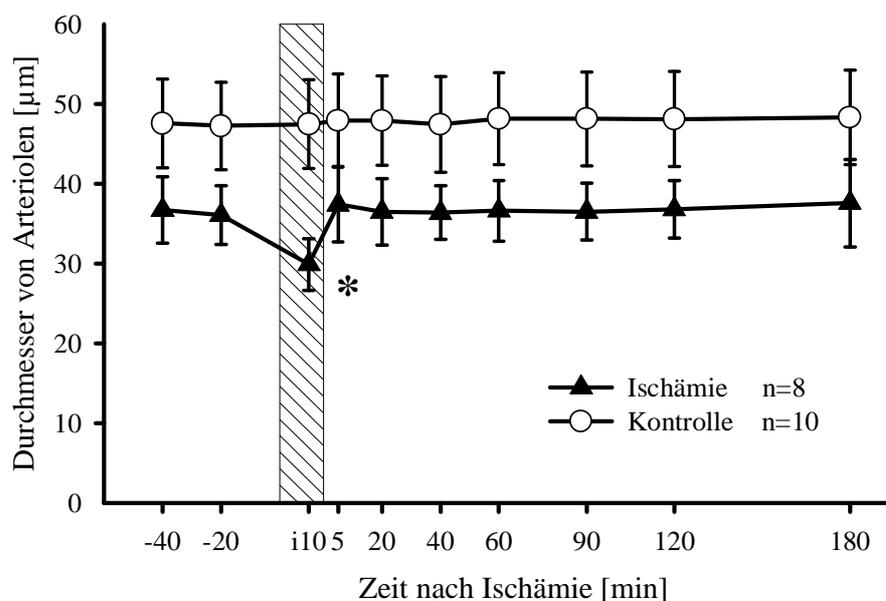


Abb. 16 Verlauf der arteriellen Gefäßweite (μm) von Tieren mit 15-minütiger globaler zerebraler Ischämie (Dreieck-Symbole) vor, während und nach Ischämie im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (Kreis-Symbole); * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test). Der schraffierte Balken symbolisiert die Ischämiephase.

Der Durchmesser von postkapillären Venolen (Abb. 17) der Kontrolltiere veränderte sich nicht während des Versuchs. Die Tiere mit globaler zerebraler Ischämie hatten hingegen Schwankungen der Gefäßdurchmesser, die jedoch nicht signifikant waren. Während Ischämie

kam es erwartungsgemäß zu einer Abnahme, unmittelbar nach Ischämie (5 min) dagegen waren die Venolen mäßig erweitert, erreichten aber im Anschluss daran wieder ihren präischämischen Kontrollwert. Es fiel auf, dass die durch Intravitalmikroskopie erhobenen Befunde der Vasomotorik von Venolen den Veränderungen der mit Hilfe von Laser-Doppler-Fluxmetrie oder arteriovenöser Transitzeit gemessenen Hirndurchblutung (Abschnitt 3.2.1.2) entsprachen.

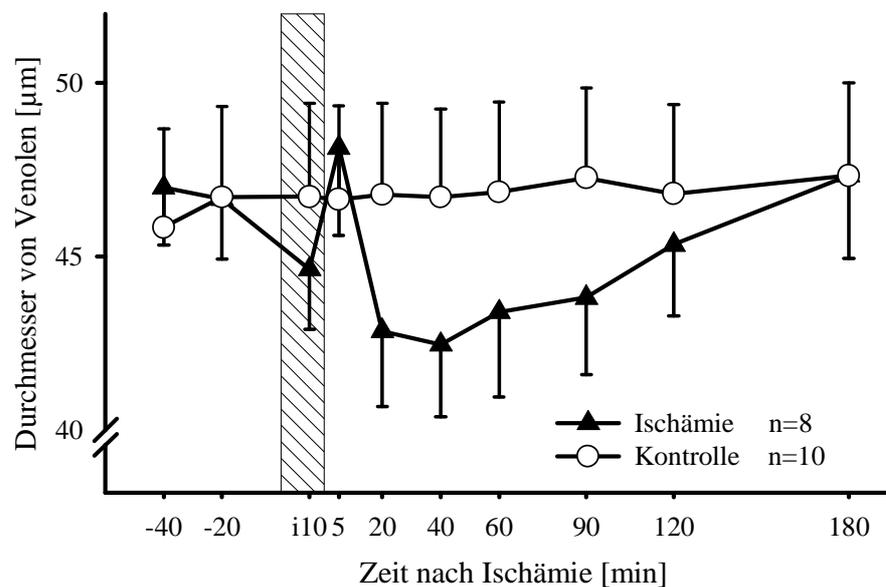


Abb. 17 Gefäßdurchmesser von postkapillären Venolen vor, während und nach Ischämie (Dreieck-Symbole) im Vergleich zur Gefäßweite von Kontrolltieren (Kreis-Symbole). Der schraffierte Balken symbolisiert die Ischämiephase.

3.2.2 Laser-Doppler-Fluxmetrie

Die Veränderungen der mit Laser-Doppler-Fluxmetrie (Abb. 18) gemessenen Durchblutung sind in Prozent des Ausgangswerts dargestellt. Dieser Wert ist dem Mittelwert der Stabilisierungsphase vor Ischämie äquivalent. Der bei den Kontrolltieren gemessene Flux blieb während der gesamten Beobachtungsphase konstant. Es kam zu allenfalls geringfügigen Schwankungen (maximal $\pm 12\%$), die zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant waren. In der Gruppe mit zerebraler Ischämie sank der Flux während Karotisokklusion auf etwa 15%

des Ausgangswertes ab ($p < 0,05$). Intravitalmikroskopisch konnten in dieser Phase nur geringfügige, atemabhängige Bewegungen der Blutsäule in den Gefäßen beobachtet werden. Nach Ischämie kam es sofort zur reaktiven Hyperämie mit Maximum nach 15 min. Der Hyperämie folgte nach ca. 25 min eine verzögerte Hypoperfusion des Gehirns. Nach weiteren 20 min erholte sich die zerebrale Durchblutung mit Erreichen des Ausgangsniveaus. Die Hirndurchblutung in der Reperfusionphase – initiale Hyper- und verzögerte Hypoperfusion – zeigte allerdings nur einen Trend, signifikante Unterschiede wurden nicht erreicht (Abb. 18).

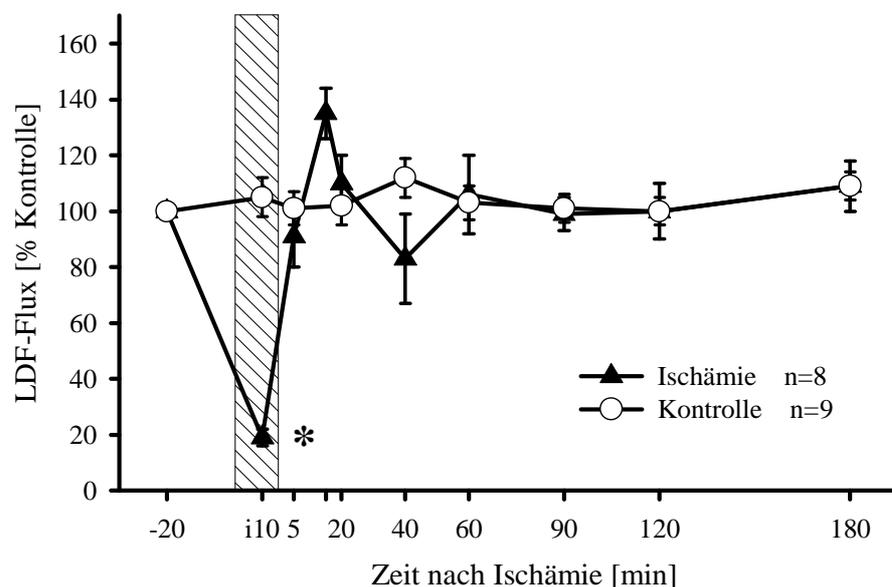


Abb. 18 Durchblutung des Gehirns vor, während und nach Ischämie (Laser-Doppler Fluxmetrie (LDF)). Bei Kontrolltieren ohne Ischämie (Kreis-Symbole) änderte sich die Durchblutung nicht. Im Gegensatz dazu fiel die Durchblutung während Ischämie erwartungsgemäß drastisch ab. Im weiteren Verlauf deutete sich in dieser Gruppe eine frühe Hyperämie mit daran anschließender verzögerter Hypoperfusion an. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test).

Gleichwohl war eine charakteristische postischämische Hyper- und verzögerte Hypoperfusionsphase in allen Versuchen erkennbar, wobei individuelle Unterschiede in der Latenz bis zum Einsetzen der Durchblutungsveränderungen bestanden. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 19 der Verlauf der Hirndurchblutung von ischämischen Tieren zu verschiedenen Zeiten, d. h. in der Kontrollphase, während Ischämie, einschließlich des Maximums und Minimums der Durchblutung in der Reperfusionphase und am Ende des Experiments

dargestellt. Die Maxima und Minima der Hirndurchblutung von Tieren mit zerebraler Ischämie (14 ± 2 min und 66 ± 17 min post Ischämie) unterschieden sich signifikant von der Durchblutung der Kontrolltiere.

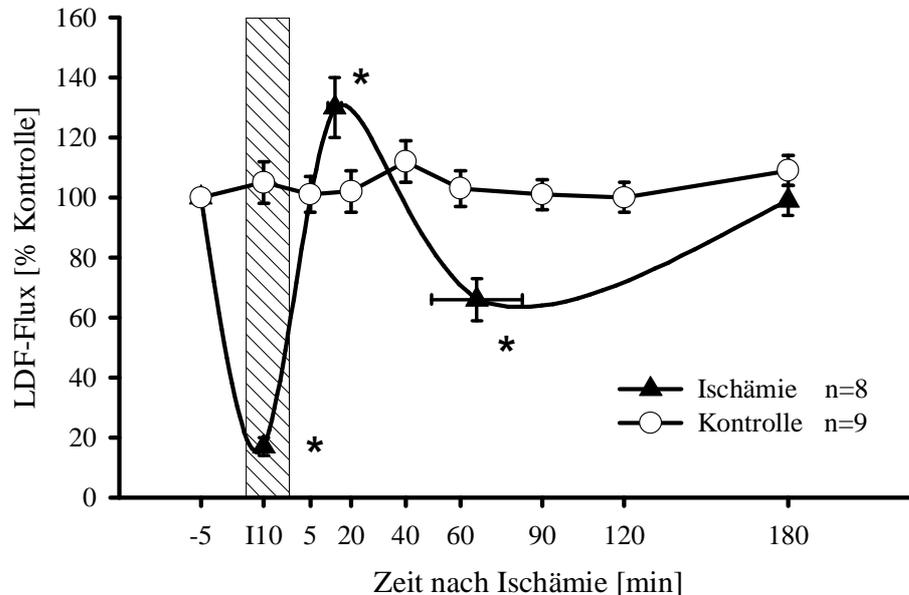


Abb. 19 Verlauf der Hirndurchblutung (LDF) von Kontrolltieren und Tieren mit globaler zerebraler Ischämie unter ausschließlicher Berücksichtigung der Perfusionsminima und -maxima in der Reperfusionphase; $MW \pm SEM$. * $p < 0,05$; (Mann-Whitney-U-Test)

3.2.3 Arteriovenöse Transitzeit

Die Veränderungen der arteriovenösen Transitzeit (Abb. 20) sind ebenfalls in Prozent des Ausgangswerts – dem Mittelwert der in der Stabilisierungsphase gemessenen Durchblutungen – dargestellt. Es ergab sich ein den Befunden der LDF-Messungen entsprechender Verlauf mit signifikanter Abnahme während Ischämie und nachfolgender Hyper- und Hypoperfusion, jedoch ohne signifikante Abweichungen während der Reperfusionphase gegenüber den Transitzeiten der Kontrolltiere.

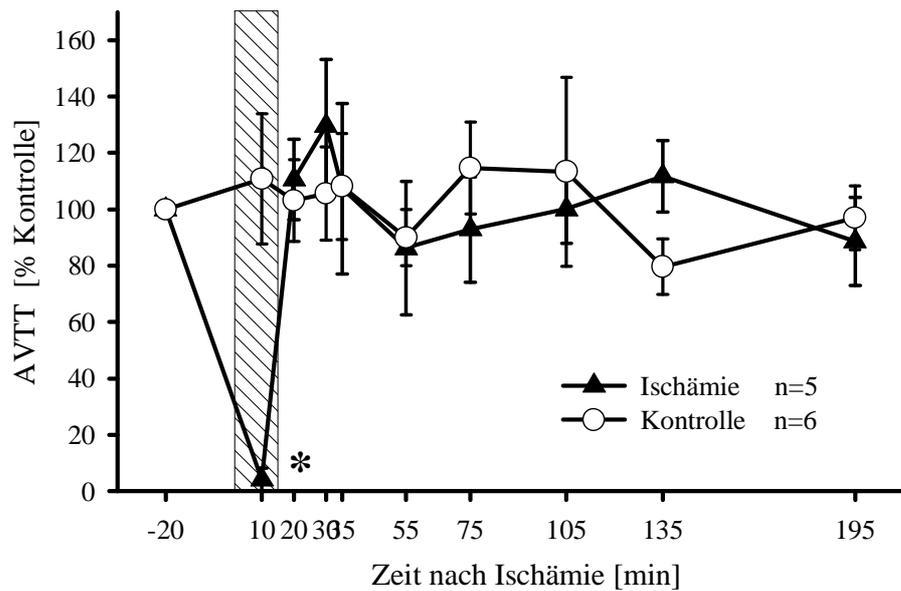


Abb. 20 Verlauf des Kehrwerts der arteriovenösen Transitzeit als Maß der zerebralen Durchblutung vor, während und nach Ischämie. Die Veränderungen sind in Prozent des Ausgangswerts während der Stabilisierungsphase vor Ischämie gezeigt. Während Ischämie fällt der Kehrwert der AVTT signifikant ab. Bei Tieren mit Ischämie ist die postischämische Hyper- und verzögerte Hypoperfusion als Andeutung zu erkennen, jedoch ohne Signifikanz im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Ischämie. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test).

3.2.4 Korrelation LDF und AVTT

Es wurde geprüft, ob sich die arteriovenöse Transitzeit als intravitalmikroskopische Methode eignet, Veränderungen der lokalen zerebralen Durchblutung empfindlich zu erfassen. Bei der globalen zerebralen Ischämie wurden besonders ausgeprägte Veränderungen erwartet. Die Messung der lokalen zerebralen Durchblutung mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie diente als Referenz. In Abb. 21 sind die Fluktuationen der regionalen Durchblutung während und nach Ischämie als Kehrwert der arteriovenösen Transitzeit und als Laser-Doppler-Flux derselben Versuchs- und Kontrolltiere im Versuchsverlauf dargestellt.

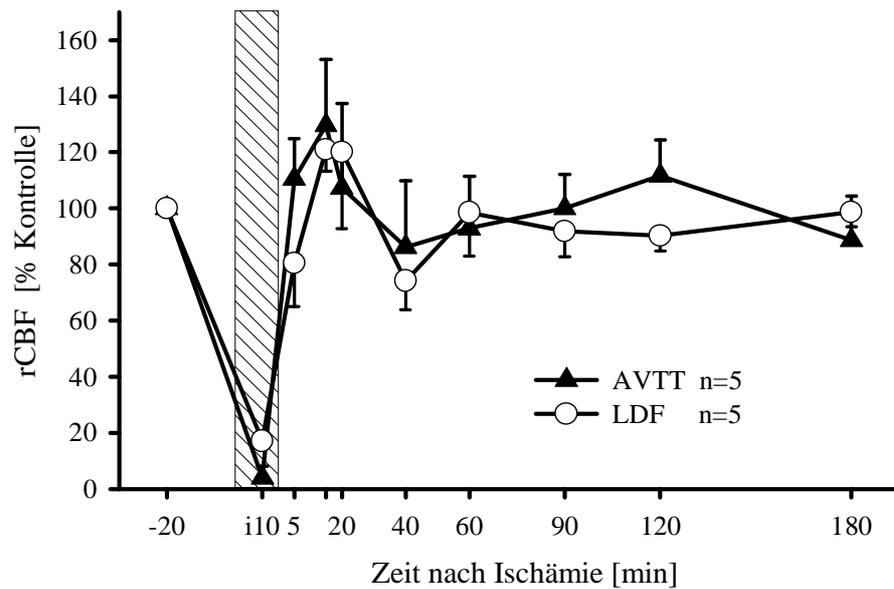


Abb. 21 Lokale Hirndurchblutung vor, während und nach globaler zerebraler Ischämie in Prozent des Ausgangswert als Kehrwert der arteriovenösen Transitzeit eines Rhodamin-Bolus (Dreieck-Symbole) und als zeitgleich gemessener Laser-Doppler Flux (Kreis-Symbole). Beide Methoden ergeben eine signifikante Verminderung der Durchblutung während Ischämie mit postischämischer Hyper- und verzögerte Hypoperfusion. * $p < 0,05$ im Vergleich zum Ausgangswert (Mann-Whitney-U-Test).

Eine Regressionsanalyse (Abb. 22) der Ergebnisse beider Methoden ergab eine signifikante Korrelation mit hohem Regressionskoeffizienten ($R=0,751$) zwischen der Laser-Doppler-Fluxmetrie und der arteriovenösen Transitzeit.

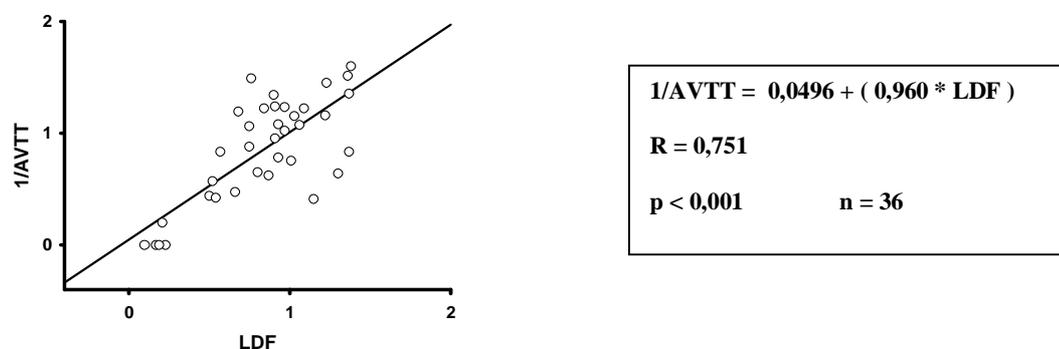


Abb. 22 Regression von intravitalmikroskopisch ermittelter arterio-venöser Transit-Zeit (Kehrwert) als Maß der Veränderung der zerebralen Durchblutung und Laser-Doppler Flux als Referenz. Zwischen beiden unabhängig voneinander bestimmten Messgrößen besteht eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) mit hohem Regressionskoeffizienten ($R=0,751$).

3.2.5 Leukozyten-Endothelinteraktionen – Leukozytenrollen

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Leukozyten-Endothelinteraktion graphisch (Abb. 23–28) dargestellt. Solche Interaktionen wurden nur in den postkapillären Venolen beobachtet; in Arteriolen wurden keine Interaktionen gesehen, noch Kapillaren dauerhaft verlegende Leukozyten gefunden.

In der Kontrollgruppe kam es zu keiner Zeit zu einer signifikanten Zunahme von rollenden Leukozyten (Abb. 23). Die Häufigkeit von unter Kontrollbedingungen am Endothel entlangrollenden Leukozyten war 0 bis $1,7 \pm 0,6$ pro $100 \mu\text{m}$ und Minute. Eine spontane Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen ohne ischämischen Insult war somit nicht erkennbar. Ebenso wenig konnten Leukozyten-Endothelinteraktionen in der Kontrollphase vor Karotisokklusion bei Tieren mit Ischämie beobachtet werden. In der frühen Reperfusion nach Ischämie hingegen kam es zum kontinuierlichen Anstieg der Zahl rollender Leukozyten. Bereits eine Stunde nach Einsetzen der Reperfusion erreichte die Häufigkeit rollender Leukozyten ein signifikantes Niveau gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe; sie nahm bis zum Ende der intravitalmikroskopischen Beobachtung, 3 h nach Ischämie, stetig zu mit einem Maximum von $34,3 \pm 7,4$ Zellen pro $100 \mu\text{m}$ und Minute. Aus dem in Abb. 23 gezeigten Verlauf der Aktivierung von rollenden Leukozyten kann ein weiterer Anstieg über 3 h nach Reperfusionbeginn hinaus angenommen werden.

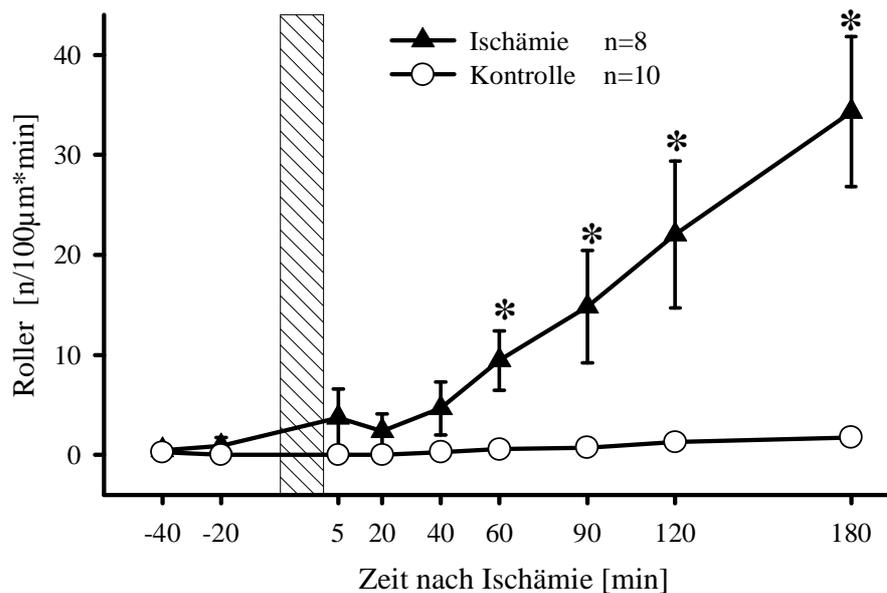


Abb. 23 Häufigkeit rollender Leukozyten. Vor dem ischämischen Insult kam es nicht zur Aktivierung von Leukozyten. Bei Kontrolltieren (Kreis-Symbole) ohne Ischämie war auch im weiteren Verlauf während des ganzen Beobachtungszeitraums keine Aktivierung von Leukozytenrollen zu sehen. Dagegen führt die 15-minütige Ischämie (Dreieck-Symbole) zur prompten, bereits nach 60 min statistisch signifikanten, Zunahme mit einem Maximum von 34 Zellen pro 100 µm und Minute nach 3 h Reperfusion. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test). Der schraffierte Balken symbolisiert die Ischämiephase des Experiments.

3.2.6 Leukozyten-Endothelinteraktionen – Leukozytenadhärenz

Wie beim Rollen von Leukozyten wurde bei den Kontrolltieren ohne Ischämie keine nennenswerte Aktivierung der Adhärenz von Leukozyten am Endothel von Venolen beobachtet (Abb. 24). Die Häufigkeit adhärenter Zellen (Sticker) verblieb bei 0 bis $0,1 \pm 0,2$ Zellen pro Messzeitpunkt, d. h. Sticker wurden nur gelegentlich in einzelnen Venolen gesehen. Bei den Tieren mit Ischämie hingegen kam es mit Einsetzen der Reperfusion zu einer ansteigenden Häufigkeit adhärenter Zellen. Die meisten Sticker wurden auch hier 3 h nach Ischämie gefunden, ihre Zahl war mit $2,3 \pm 0,9$ Zellen/100 µm * min jedoch deutlich geringer als die der Roller am Ende des akuten Experiments.

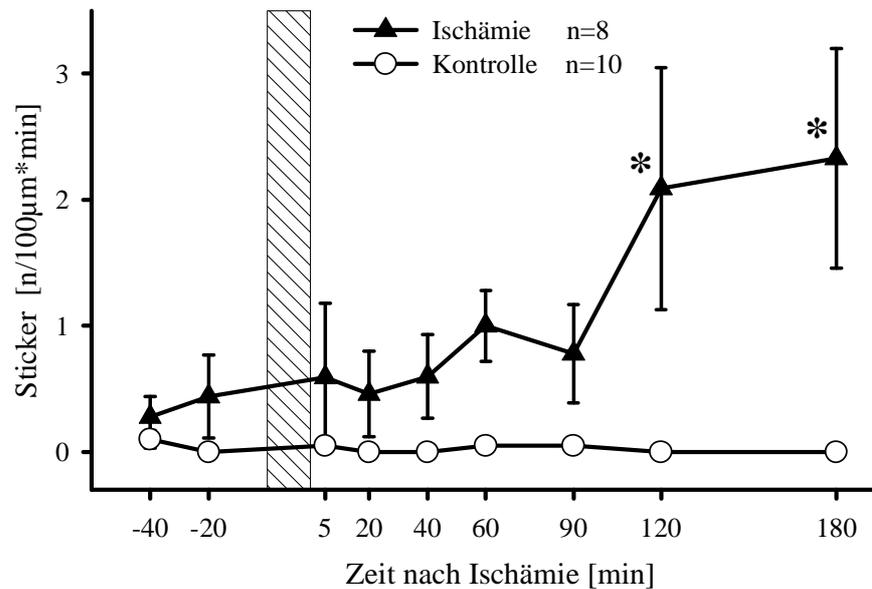


Abb. 24 Häufigkeit von an der Gefäßinnenwand adhärenen Leukozyten (Sticker). Wie beim Leukozytenrollen kam es vor Ischämie zu keiner Leukozytenaktivierung, ebenso nicht bei den Kontrolltieren ohne Ischämie. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurden bei diesen Tieren (Kreis-Symbole) keine adhärenen Leukozyten gefunden. Im Gegensatz dazu bewirkte die 15 min Ischämie (Dreieck-Symbole) eine signifikante Zunahme von am venulären Endothel adhärenen Leukozyten (Sticker), insbesondere 2 h und 3 h nach Beginn der Reperfusion. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test). Der schraffierte Balken symbolisiert die Ischämiephase.

In den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen sind die identischen Gefäße der Hirnoberfläche während der präischämischen Stabilisierungsphase (Abb. 25) und 3 h (Abb. 26) nach Ischämie dargestellt. Mit Rhodamin 6G gefärbte Leukozyten sind deutlich zu erkennen. Eine Unterscheidung von Rollern, Stickern und frei im Blutstrom fließenden Leukozyten ist allerdings nur durch Bild-zu-Bild Analyse des Videofilms möglich. In der in Abb. 25 und 26 mit A identifizierten Arteriole sind keine Leukozyten sichtbar.

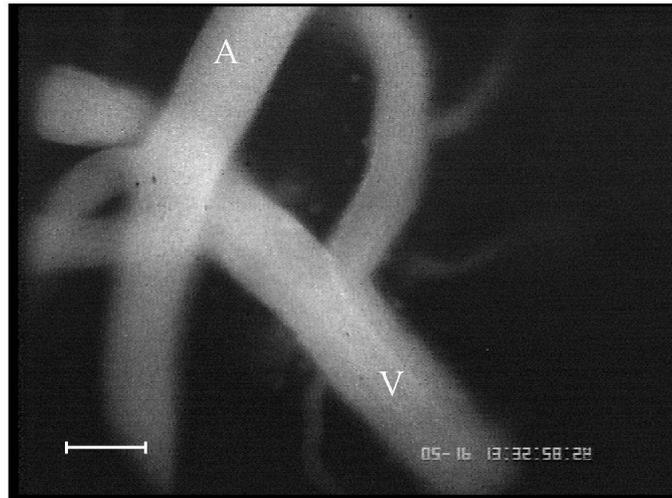


Abb. 25 Intravitalmikroskopisches Bild der Hirnoberfläche eines Gerbils der Kontrollphase vor Ischämie. Die Aufricht-Fluoreszenzmikroskopie mit Verwendung geeigneter Farbstoffe – hier Fluoreszein markiertes hochmolekulares Dextran (FITC-Dextran) – ermöglicht die Darstellung der Gefäße der Mikrozirkulation mit hohem Kontrast. Der Ausschnitt zeigt piale Gefäße des Kortex. In der Kontrollphase sind keine mit dem Endothel interagierenden Leukozyten sichtbar (Aufnahme mit einem Kombinationsfilter, das Rhodamin markierte Leukozyten erkennen läßt). Mit A ist eine Arteriole, mit V eine Venole beschriftet. Der Maßstab entspricht 50 μm .

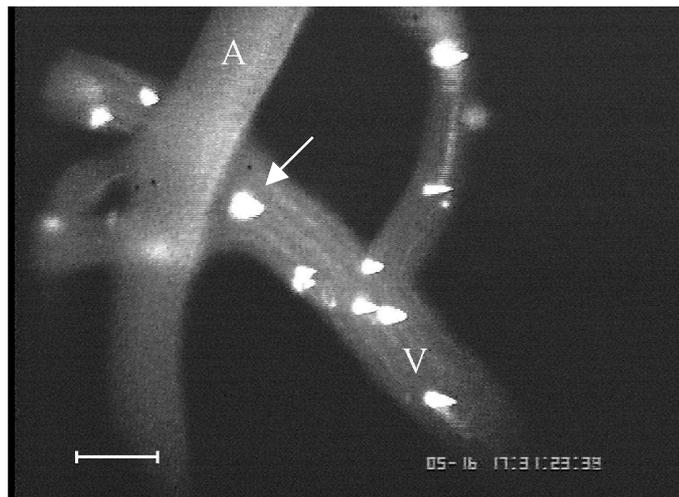


Abb. 26 Intravitalmikroskopische Aufnahme des gleichen in Abb. 25 gezeigten Areals der Hirnoberfläche 3 h nach Ischämie mit identischen Gefäßen. Die hellen Punkte sind mit Rhodamin markierte, an der Gefäßinnenwand von Venolen entlangrollende oder adhärenente Leukozyten. Durch Bild-zu-Bild Analyse kann Leukozytenrollen und -adhärenz unterschieden werden. Mit A ist eine Arteriole, mit V eine Venole und mit dem Pfeil ein Leukozyt markiert. Der Maßstab entspricht 50 μm .

3.2.7 Leukozytenrollen – späte experimentelle Phase

Auch in der späten experimentellen Phase, 6 und 7 h nach Ischämie, war bei den Tieren der Kontrollgruppe ohne Ischämie keine Leukozytenaktivierung zu sehen. Bei den Tieren mit Ischämie hatte die Anzahl von rollenden Leukozyten (im Vergleich zur Häufigkeit 3 h nach Ischämie) wieder abgenommen. Dennoch war auch nach 6 h deren Zahl ($5,7 \pm 2,6$) noch signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe ($0,1 \pm 0,1$). Erst 7 h nach Reperfusionbeginn wurde kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt (Abb. 27).

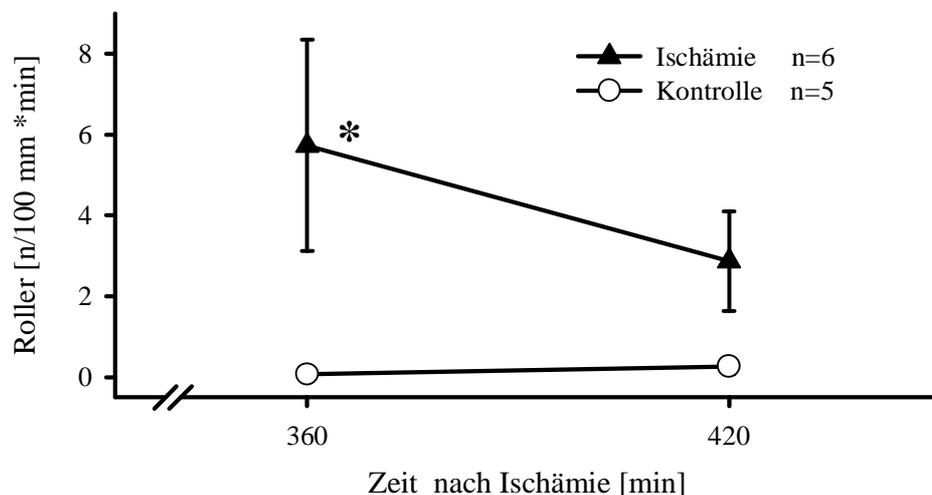


Abb. 27 Häufigkeit rollender Leukozyten in der späten experimentellen Phase, 6 und 7 h nach Ischämie. Die Anzahl von rollenden Leukozyten – Roller – war auch 6 h nach Ischämie noch signifikant erhöht. Allerdings hatte die Häufigkeit gegenüber dem Maximum des Leukozytenrollens (3 h nach Ischämie) wieder abgenommen; 7 h nach Ischämie war kein Unterschied mehr gegenüber den Tieren Kontrollgruppe festzustellen. * $p < 0,01$ vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test).

3.2.8 Leukozytenadhärenz – späte experimentelle Phase

Ähnlich wie bei den rollenden Zellen verhielt es sich mit der Zahl adhärenter Leukozyten (Abb. 28). Die zerebrale Ischämie war, 6 h nach Insult, von einem signifikanten Anstieg der Zahl adhärenter Zellen ($1,2 \pm 0,3$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 ± 0) gefolgt. Allerdings war die Aktivierung der Leukozytenadhärenz zu diesem Zeitpunkt schon wieder rückläufig im

Vergleich zu dem 3 h nach Ischämie erhobenen Befund. Sieben Stunden nach Ischämie bzw. Einsetzen der Reperfusion bestand kein Unterschied mehr zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Ischämie.

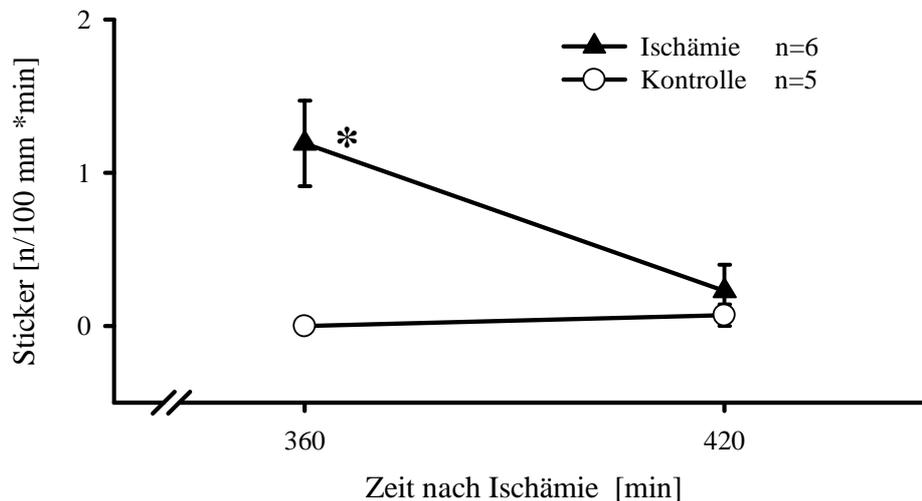


Abb. 28 Häufigkeit adhärenter Leukozyten in der späten experimentellen Phase (6 und 7 h) nach Ischämie. Die Anzahl adhärenter Leukozyten – Sticker - war 6 h nach Ischämie noch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dennoch hatte die Zahl von Stickern 6 h nach Ischämie im Vergleich zum Maximum (3 h nach Ischämie) wieder abgenommen. Sieben Stunden nach Ischämie war kein signifikanter Unterschied mehr festzustellen. * $p < 0,01$ vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test).

3.2.9 Gefäßdurchmesser in der späten experimentellen Phase

Wie in der frühen Reperfusionphase kam es im weiteren Verlauf (6 und 7 h nach Ischämie) nur in den postkapillären Venolen zum Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen. Die in dieser Phase gefundenen Durchmesser von Venolen und Arteriolen sind in Tab. 8 wiedergegeben. Signifikante Veränderungen im Verlauf oder Unterschiede zwischen Ischämie- und Kontrolltieren wurden nicht festgestellt. Auch im Vergleich zu den in der frühen Reperfusionphase beobachteten Gefäßweiten von Venolen und Arteriolen waren die später erhobenen Befunde nicht signifikant verändert.

	Venolen [μm]		Arteriolen [μm]	
6 h nach Ischämie	Kont.: 31 ± 1	Isch.: 39 ± 4	Kont.: 31 ± 4	Isch.: 35 ± 6
7 h nach Ischämie	Kont.: 34 ± 3	Isch.: 39 ± 3	Kont.: 33 ± 4	Isch.: 41 ± 8

Tab. 8 Durchmesser von pialen Venolen und Arteriolen der Hirnoberfläche in der späten experimentellen Phase (6 und 7 h nach Ischämie). Die Kaliber wurden intravitalmikroskopisch bei 5 Kontrolltieren (Kont.) und 6 Tieren mit Ischämie (Isch.) bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht.

3.2.10 Kapillardichte

Die Kapillardichte (KD) blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum in beiden Versuchsgruppen konstant. Die Werte der Kontrollgruppe lagen zwischen $152 \pm 11 \text{ cm}^{-1}$ und $174 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$, der Tiere mit globaler zerebraler Ischämie zwischen $154 \pm 23 \text{ cm}^{-1}$ und $180 \pm 54 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 29). Kapillaren verlegende Leukozyten – sogenannte *Plugger* – wurden nicht beobachtet. Nur bei 3 bzw. 4 Tieren der Ischämie- und Kontrollgruppe konnte die Hirnoberfläche intravitalmikroskopisch so deutlich dargestellt werden, dass eine Beurteilung der Perfusion der identischen Mikrogefäße während des gesamten Beobachtungszeitraums möglich war. Die Einschränkung beruhte darauf, dass Kapillaren in der Umgebung größerer Gefäße wegen der hier stärker ausgeprägten Fluoreszenzemission nicht klar abgegrenzt werden konnten.

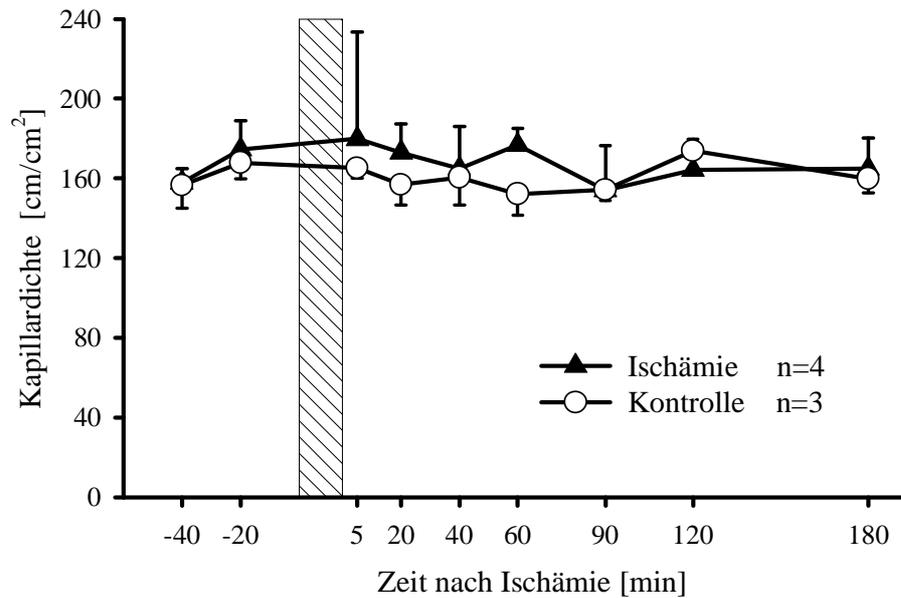


Abb. 29 Funktionelle Kapillardichte der Hirnoberfläche von jeweils 3 Kontroll- und 4 Versuchstieren vor, während und nach Ischämie ($MW \pm SEM$). Signifikante Veränderungen wurden nicht gefunden.

3.2.11 Blut-Hirnschranke

Die Integrität der Blut-Hirnschranke wurde bei 8 Tieren mit Ischämie und 10 Kontrolltieren am Ende des akuten Versuchs intravitalmikroskopisch geprüft. In keinem Fall kam es zur Eröffnung der Schranke mit Extravasation von Na^+ -Fluoreszein in das Hirnparenchym. Der niedermolekulare Schrankenindikator Na^+ -Fluoreszein (MW: 376 u) war auch 20 min nach intravenöser Infusion bei den Tieren mit und ohne Ischämie nur intravasal lokalisiert. Erwartungsgemäß wurde auch keine Extravasation von FITC-Dextran (MW: 150.000 u) beobachtet. Allerdings wurde gelegentlich bei einigen Versuchstieren durch die Präparation des Schädelfensters eine unbeabsichtigte Eröffnung der Blut-Hirnschranke – als Ausschlusskriterium – hervorgerufen. Abb. 30 zeigt einen Ausschnitt der Hirnoberfläche eines Versuchstieres (a) 180 min nach Ischämie mit intakter Schranke und (b) nach Extravasation von Na^+ -Fluoreszein durch Verletzung der Blut-Hirnschranke während der Präparation.

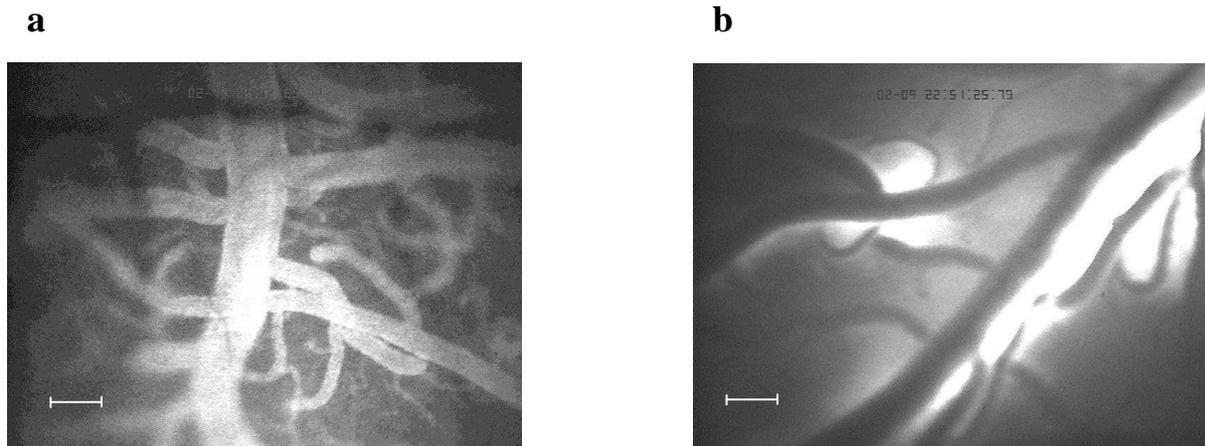


Abb. 30 Fluoreszenzmikroskopische Übersicht der Hirnoberfläche (a) mit intakter Blut-Hirnschranke – erkennbar an der ausschließlich intravasalen Lokalisation des Schrankenindikators Na^+ -Fluoreszein bei einem Tier 3 h nach Ischämie; (b) mit massiver Eröffnung der Schranke, erkennbar an dem Austritt von Na^+ -Fluoreszein in das Parenchym und perivaskulärer Anreicherung bei einem Tier mit Schädigung der Dura mater. Der Maßstab entspricht 100 μm .

3.2.12 Körpergewicht nach Ischämie

Zur Beurteilung der Tiere in der postischämischen Erholungsphase wurde täglich das Körpergewicht bestimmt und der neurologischer Status erhoben. In Abb. 31 ist der Gewichtsverlauf dargestellt; am Tag 0 wurde der Akutversuch durchgeführt. Präoperativ hatte zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den Versuchstieren mit Ischämie kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts bestanden. Immerhin kam es auch bei den Kontrolltieren am ersten Tag zu einem signifikanten Gewichtsverlust – danach nicht mehr. Die Versuchstiere mit Ischämie hatten dagegen eine kontinuierliche Abnahme ihres Körpergewichts. Am 2. und 3. Tag nach Ischämie war dieser Gewichtsverlust statistisch signifikant.

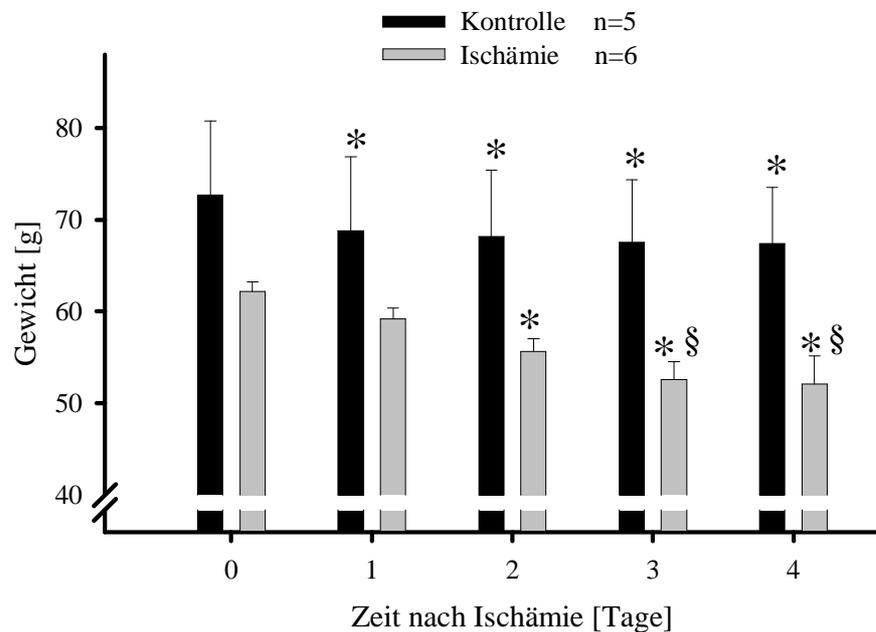


Abb. 31 Verlauf des Körpergewichts von Versuchs- und Kontrolltieren. Alle Tiere – ob mit oder ohne Ischämie – hatten nach dem Akutversuch, der intravitalmikroskopischen Beobachtung der Hirnoberfläche, abgenommen. Bei den Kontrolltieren ohne Ischämie blieb das Körpergewicht danach stabil, die Versuchstiere mit ischämischem Insult nahmen dagegen weiter ab. * $p < 0,05$ (Dunnet-Test vs. Tag 0); § $p < 0,05$ (Dunnet-Test vs. Tag 2).

3.2.13 Neurologischer Score

Die tägliche Prüfung des neurologischen Defizits einschließlich Spontanverhalten ergab bei den Kontrolltieren ohne Karotisokklusion keine pathologischen Veränderungen (Abb. 32). Andere Ergebnisse hingegen wurden bei den Tieren mit Ischämie erzielt. Vom ersten Tag nach Ischämie an kam es zu einer signifikanten Verschlechterung des neurologischen Scores, bis auf ein Minimum von 12 Punkten am 4. Tag. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren diese Veränderungen am ersten, zweiten und dritten Tag nach Ischämie statistisch signifikant.

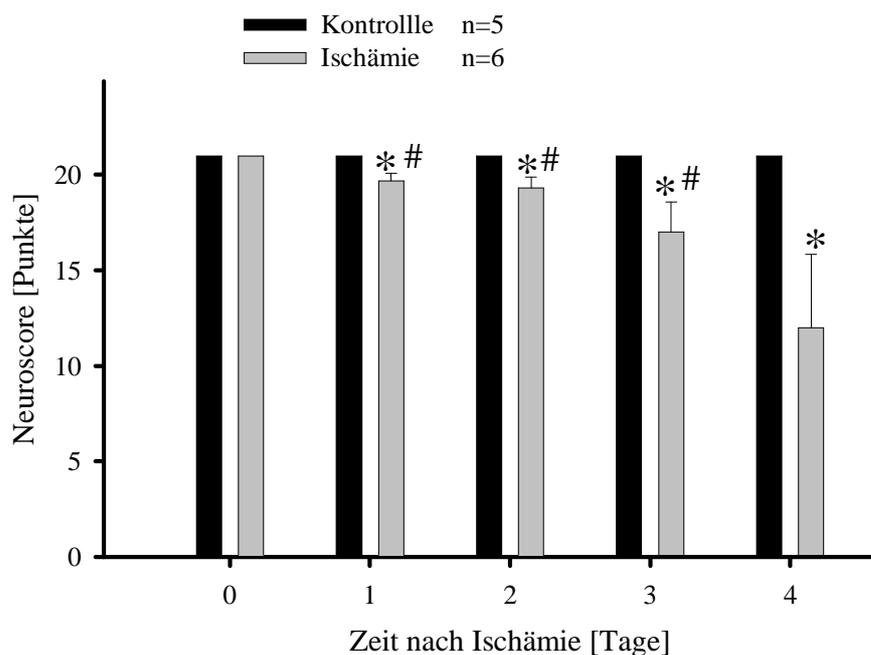


Abb. 32 *Neuroscore von Kontroll- und Versuchstieren. Kein Tier der Kontrollgruppe ohne Ischämie zeigte sich bei der täglichen neurologischen Untersuchung einschließlich Verhalten beeinträchtigt. Tiere mit Ischämie hingegen hatten ein täglich zunehmendes neurologisches Defizit. # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, (Mann-Whitney-U-Test); * $p < 0,05$ vs. Tag 0 (Dunnet-Test)*

3.2.14 Histologie

Hippocampus

In Abb. 33 ist die Nervenzellichte – die Zahl der nach Ischämie überlebenden Pyramidenzellen – in den verschiedenen Sektoren des Cornu ammonis dargestellt. Die globale zerebrale Ischämie von nur 15 min Dauer bewirkte vor allem im CA1 Sektor im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe einen signifikanten Nervenzellverlust. Auch in den CA2, CA3 und CA4 Sektoren hatte die Nervenzellichte nach Ischämie abgenommen, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

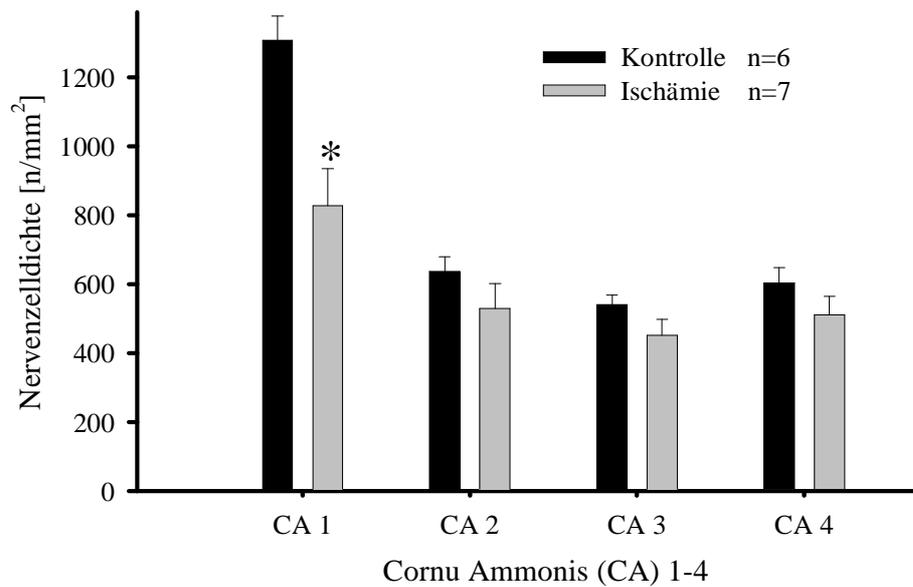


Abb. 33 Nervenzelldichte von Kontroll- und Versuchstieren am 4. Tag nach Ischämie im Cornu ammonis des Hippocampus. In allen Sektoren des Ammonshorn (CA1-CA4) hatte die Zahl der überlebenden Pyramidenzellen abgenommen. Die empfindlichste Region war der CA1 Sektor, hier hatte die Nervenzelldichte im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Ischämie statistisch signifikant abgenommen. * $p < 0,01$ vs. Kontrolle, (Student-t-Test).

Abb. 34 zeigt je einen histologischen Ausschnitt des Hippocampus mit detaillierter Darstellung der CA1 Region, (a) von einem Kontrolltier ohne Ischämie und (b) von einem Versuchstier mit besonders ausgeprägtem Schaden. Vier Tage nach Ischämie (b) waren im CA1 Sektor kaum mehr vitale Zellen vorhanden.

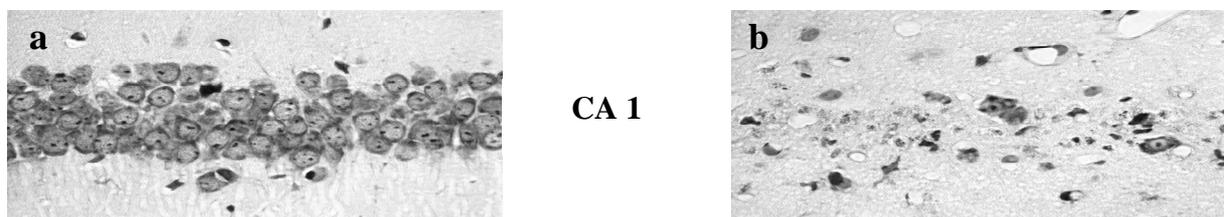
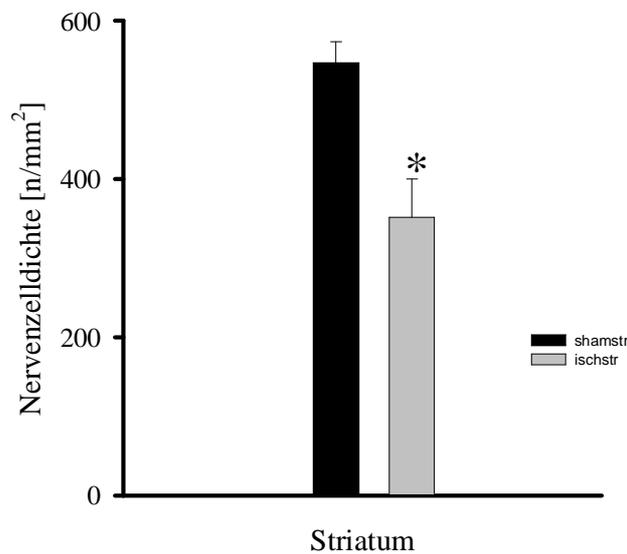


Abb. 34 Histologische Schnitte (a) von einem Kontrolltier und (b) Versuchstier 4 Tage nach Ischämie. Beide Präparate sind mit Kresylviolett nach Nissl gefärbt. Es ist jeweils der Ischämie-empfindlichste Abschnitt des Hippocampus, der CA1 Sektor, dargestellt. Ausschnitt (a) zeigt vitale Neurone mit großem Zellkern, einem abgrenzbaren Nukleolus und einem schmalen Zytoplasmasaum; (b) das kaum mehr erkennbare Neuronenband des Hippocampus als Zeichen des ausgeprägten ischämischen Schadens. Vereinzelt finden sich intakte Neurone zwischen vielen nekrotischen Zellresten.

Striatum

Auch im Striatum kam es bei Tieren mit Ischämie zum signifikanten Untergang von Nervenzellen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 35).



*Abb. 35 Anzahl vitaler Nervenzellen (Nervenzelldichte) im Striatum von Kontroll- und Versuchstieren 4 Tage nach Insult. Auch in dieser Hirnregion haben nach einer 15-minütigen globalen Ischämie signifikant weniger Nervenzellen als bei Kontrolltieren ohne Ischämie überlebt. * $p < 0,01$ vs. Kontrolle; (Student-t-Test).*

Im histologischen Schnitt des Striatums eines Tieres mit Ischämie (4 Tage nach dem Insult, Abb. 36) ist der Parenchymschaden mit Verlust von vitalen Neuronen im Vergleich zum Kontrolltier deutlich zu sehen. Die verbliebenen avitalen Zellelemente sind vor allem an der Kernpyknose mit perinukleärer Vakuolisierung zu erkennen.

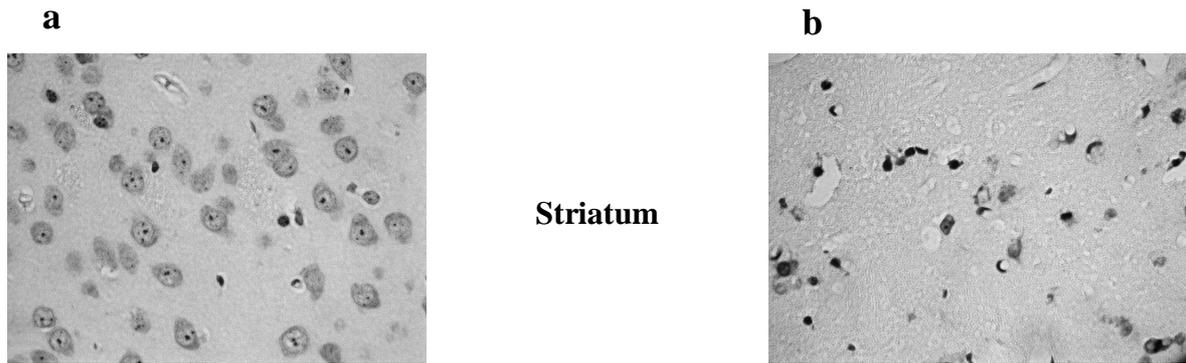
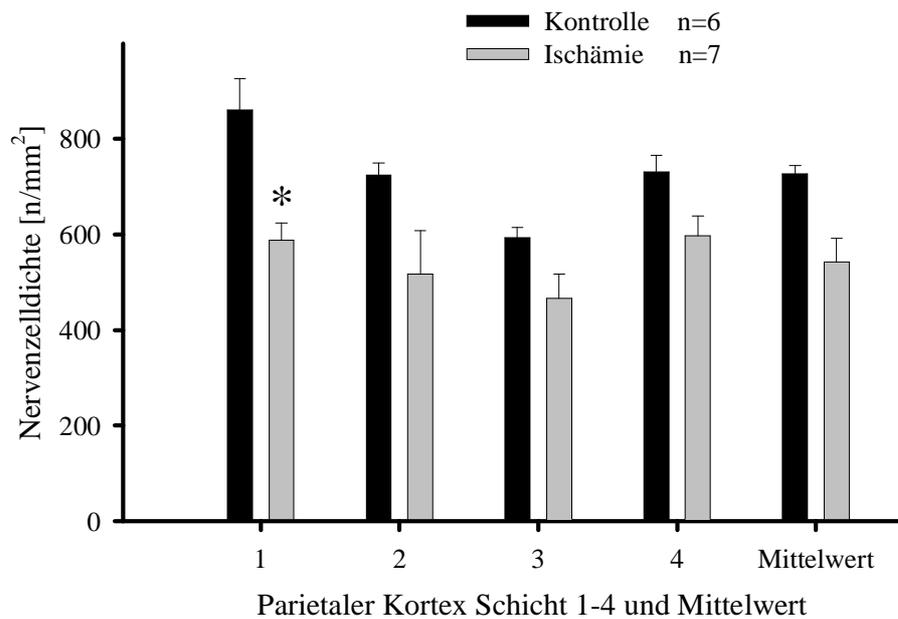


Abb.36 Histologische Schnitte (a) eines Kontrolltieres und (b) eines Versuchstiers (4 Tage nach Ischämie). Beide Präparate sind mit Kresylviolett nach Nissl gefärbt. Ein Ausschnitt des Corpus striatum ist dargestellt; (a) zeigt deutlich vitale Neurone mit großem Zellkern, Nukleolus und schmalem Zytoplasmasaum. In Ausschnitt (b) überwiegen nekrotische Neurone mit charakteristischem, pyknotischen, dunkel angefärbten Zellkern – in der englischen Literatur „dark neuron“ bezeichnet – und perinukleärer Vakuolisierung.

Kortex

Die quantitative Auswertung der histologischen Präparate der Hirnrinde ergab deutliche Verluste von Nervenzellen im frontalen und parietalen Neokortex nach Ischämie. Allerdings hatte nur die Nervenzelldichte der Oberflächen-nahen Hirnrindenschicht 1 des parietalen Kortex von Tieren mit Ischämie im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren signifikant abgenommen (Abb. 37). In den darunterliegenden Hirnrindenschichten 2-4 war die Zahl überlebender Nervenzellen zwar verringert, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen (Abb. 37).



*Abb. 37 Nervenzelldichte im parietalen Kortex von Kontroll- und Versuchstieren am 4. Tag nach Ischämie. In der Oberflächen-nahen Hirnrindenschicht 1 hatte nach der Ischämie die Zahl von überlebenden Neurone und die Nervenzelldichte statistisch signifikant abgenommen. In den anderen Hirnrindenschichten war die Nervenzelldichte nach Ischämie zwar gesunken, der Verlust erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; (Varianzanalyse, post hoc-Test: Bonferroni).*

Die zerebrale Ischämie führte auch im frontalen Kortex zum Verlust von Nervenzellen der Schichten 1, 2 und 4. Nach statistischer Prüfung konnte allerdings kein signifikanter Unterschied der Nervenzelldichte im Vergleich zur Zelldichte der Kontrolltiere gefunden werden (Abb. 38). Insgesamt war im Kortex der Verlust von Nervenzellen geringer als in den anderen Strukturen des Gehirns.

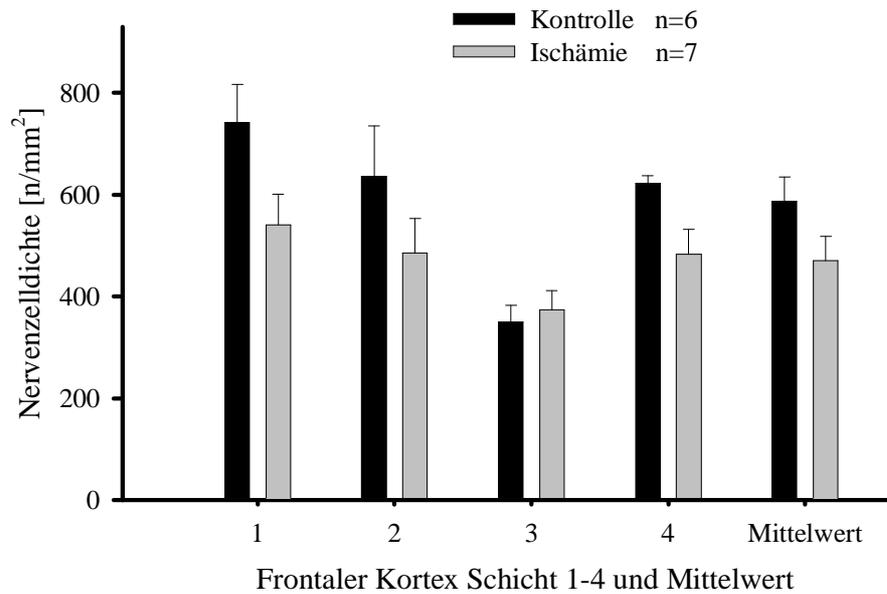


Abb. 38 *Nervenzellichte im frontalen Kortex von Kontroll- und Versuchstieren am 4. Tag nach Ischämie. In allen Schichten der Hirnrinde wurde nach Ischämie ein Verlust von überlebenden Neuronen und somit eine Abnahme der Nervenzellichte im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. (Varianzanalyse, post hoc-Test: Bonferroni).*

3.2.15 Esterasefärbung

Mit der bei den perfusionsfixierten histologischen Präparaten des Gehirns von Gerbils angewandten Esterasefärbung werden polymorphkernige Granulozyten rötlich dargestellt. Abb. 39 zeigt einen Ausschnitt des Striatums mit Gefäßen eines Tieres mit globaler Ischämie. Im Gefäßlumen ist ein Leukozyt zu erkennen, der bei der Perfusionsfixation (180 min nach Ischämie) nicht ausgeschwemmt worden ist. Weitere intravasale Zellelemente sind nicht erkennbar. Der Befund spricht dafür, dass die transitorische zerebrale Ischämie auch in den tieferen, unter der Oberfläche liegenden Hirngefäßen des Parenchyms Leukozyten-Endothelinteraktionen hervorruft, die durch die Intravitalmikroskopie der Hirnoberfläche nicht erfaßt werden. Leukozyten in tiefen, parenchymatösen Hirngefäßen konnten mit dieser Färbetechnik bei allen 3 Tieren mit Ischämie gezeigt werden. Bei keinem der beiden

Kontrolltiere (ohne zerebrale Ischämie) dagegen wurden in den Gefäßlumina Leukozyten gefunden.

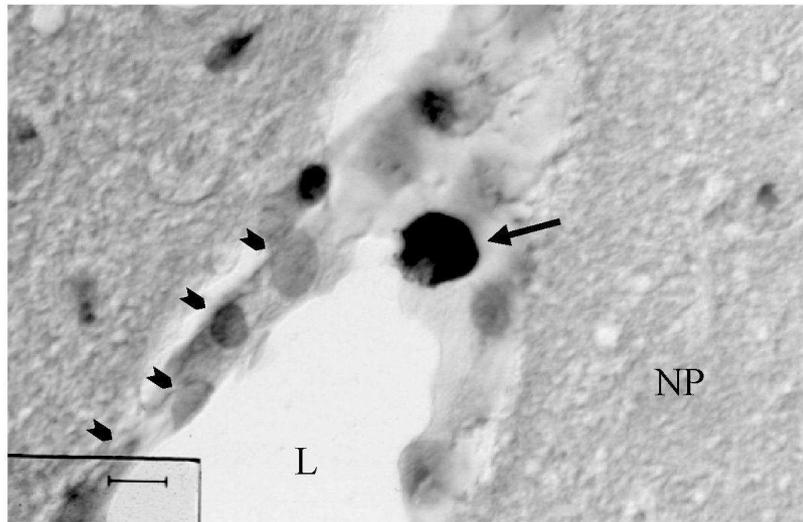


Abb. 39 Ausschnitt des Striatum von einem Gerbil. Das Gehirn wurde 3 h nach Ischämie perfusionsfixiert. Leukozyten wurden im histologischen Präparat mit Esterasefärbung markiert. In der Abbildung ist eine Venole angeschnitten. Weiterhin ist ein neutrophiler Granulozyt (Pfeil) im Intravasalraum zu erkennen sowie Endothelzellen (plumpe Pfeilspitzen), umgebendes Neuropil (NP) und ein Gefäßlumen (L) ohne weitere zelluläre Bestandteile. Der Maßstab beträgt 10 μ m.

3.3 Korrelationsanalysen

3.3.1 Leukozyten-Endothelinteraktionen und histologischer Schaden

Ein möglicher (statistischer) Zusammenhang zwischen dem Nervenzelluntergang und dem Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen wurde durch eine Regressionsanalyse von rollenden und adhärenen Leukozyten und der Zahl überlebender Nervenzellen im histologischen Präparat desselben Versuchstiers geprüft (n=6). Die graphische Darstellung (Abb. 40) zeigt zunächst Regressionen zwischen der Nervenzelldichte im parietalen und frontalen Kortex, Cornu Ammonis Sektor 1-4 des Hippocampus und Striatum und der Zahl rollender Leukozyten 180 min nach Ende der zerebralen Ischämie. Die 180 min nach Ischämieende ermittelte Häufigkeit von rollenden Zellen – zu diesem Zeitpunkt war stets ein Maximum erreicht – wurde für die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen als

repräsentativ angesehen. Von jeder Regression wurde der Korrelationskoeffizient r und das Signifikanzniveau p errechnet. Interessanterweise ergab sich eine direkt proportionale Korrelation zwischen der Häufigkeit rollender Leukozyten und der Zahl überlebender Nervenzellen. Die Analyse des gesamten parietalen Kortex, der Hirnrindenschichten 2 und 3 des parietalen Kortex, Schicht 4 des frontalen Kortex und des Striatum ergab einen signifikanten Korrelationskoeffizienten $r > 0,85$. Für die Schichten 1 des parietalen und frontalen Kortex sowie des gesamten frontalen Kortex, Cornu ammonis Sektor 1 und 2 wurden Korrelationskoeffizienten $r > 0,7$ errechnet, die jedoch das festgelegte statistische Signifikanzniveau von $p < 0,05$ knapp verfehlten ($p < 0,1$). Diesen Regressionsanalysen entsprechend wurden Korrelationen von Ausmaß der Leukozytenadhärenz und der neuronalen Schädigung berechnet (Abb. 41). Wie beim Leukozytenrollen wurde die nach 120 bzw. 180 min Reperfusion ermittelte Häufigkeit adhärenter Zellen – im Zeitpunkt des Maximums – als repräsentativ angesehen. Auch hier ergab sich entgegen den Erwartungen ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Zahl adhärenter Zellen und der Zahl überlebender Nervenzellen. Dieser Zusammenhang war jedoch statistisch weniger eng; ein signifikantes Niveau wurde nur im Striatum und der Hirnrindenschicht 3 des parietalen Kortex gefunden und für den Mittelwert aller Schichten des parietalen Kortex mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,83$ ($p < 0,05$). Für Schicht 1 und 2 des parietalen Kortex, Schicht 4 des frontalen Kortex sowie den CA4 Sektor des Hippocampus ergaben sich Korrelationskoeffizienten von $r > 0,76$ die allerdings kein statistisch signifikantes Niveau erreicht haben ($p < 0,01$).

Das Ergebnis der Korrelationsanalysen besagt, je mehr rollende und adhärente Leukozyten intravitalmikroskopisch gesehen worden sind, desto größer war die Zahl überlebender Nervenzellen in den verschiedenen Regionen des Gehirns derselben Tiere nach Ischämie.

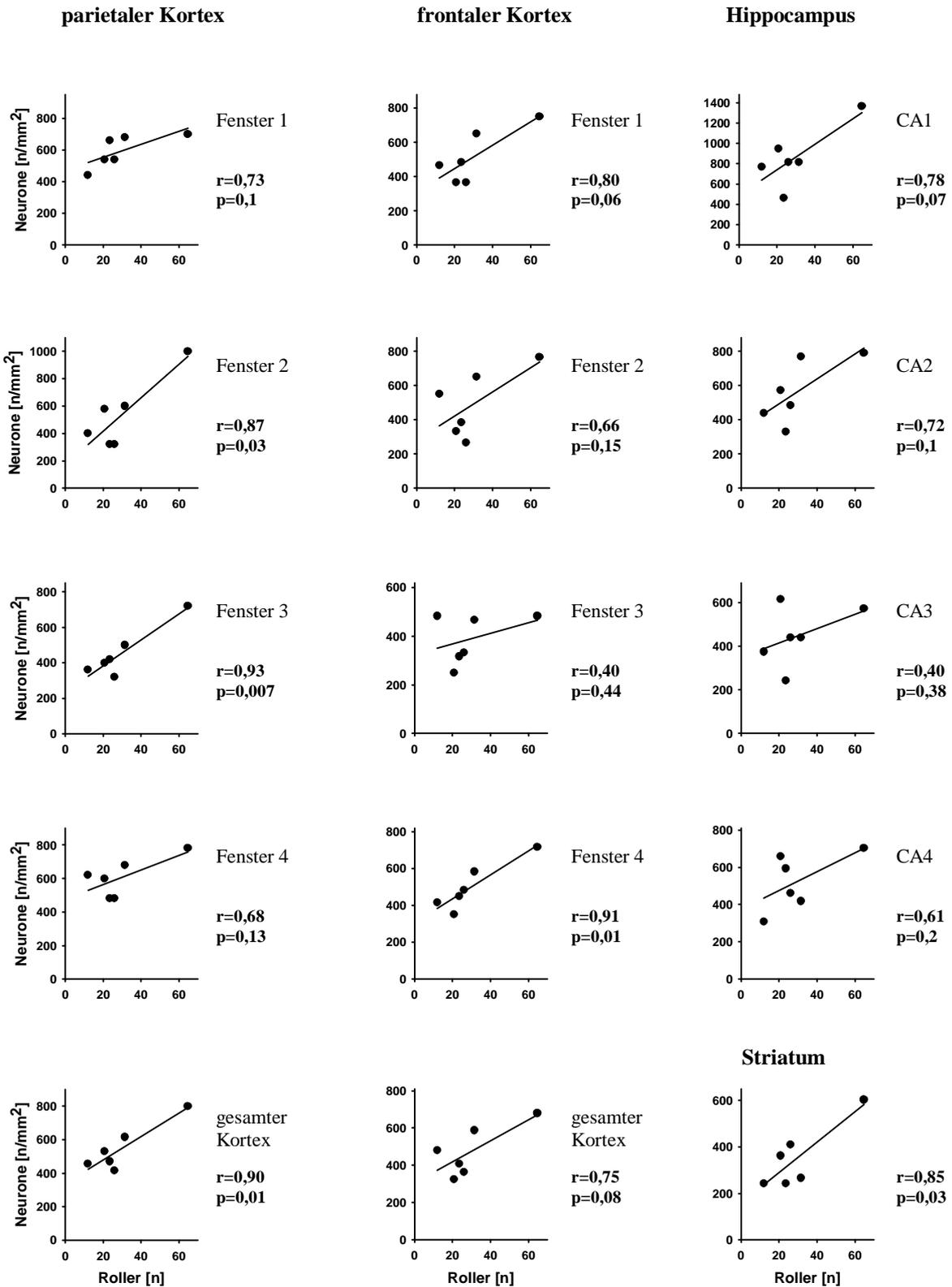


Abb. 40 Multiple Regressionsanalysen zwischen der Zahl rollender Zellen und überlebender Neurone im frontalen und parietalen Kortex (Fenster 1-4, einschließlich Mittelwert aller Messfenster), Hippocampus (CA1-4) und Striatum. Je mehr rollende Zellen in den Venolen der Hirnoberfläche gefunden wurden, desto höher war die Zahl überlebender Nervenzellen in fast allen Hirnstrukturen desselben Tiers.

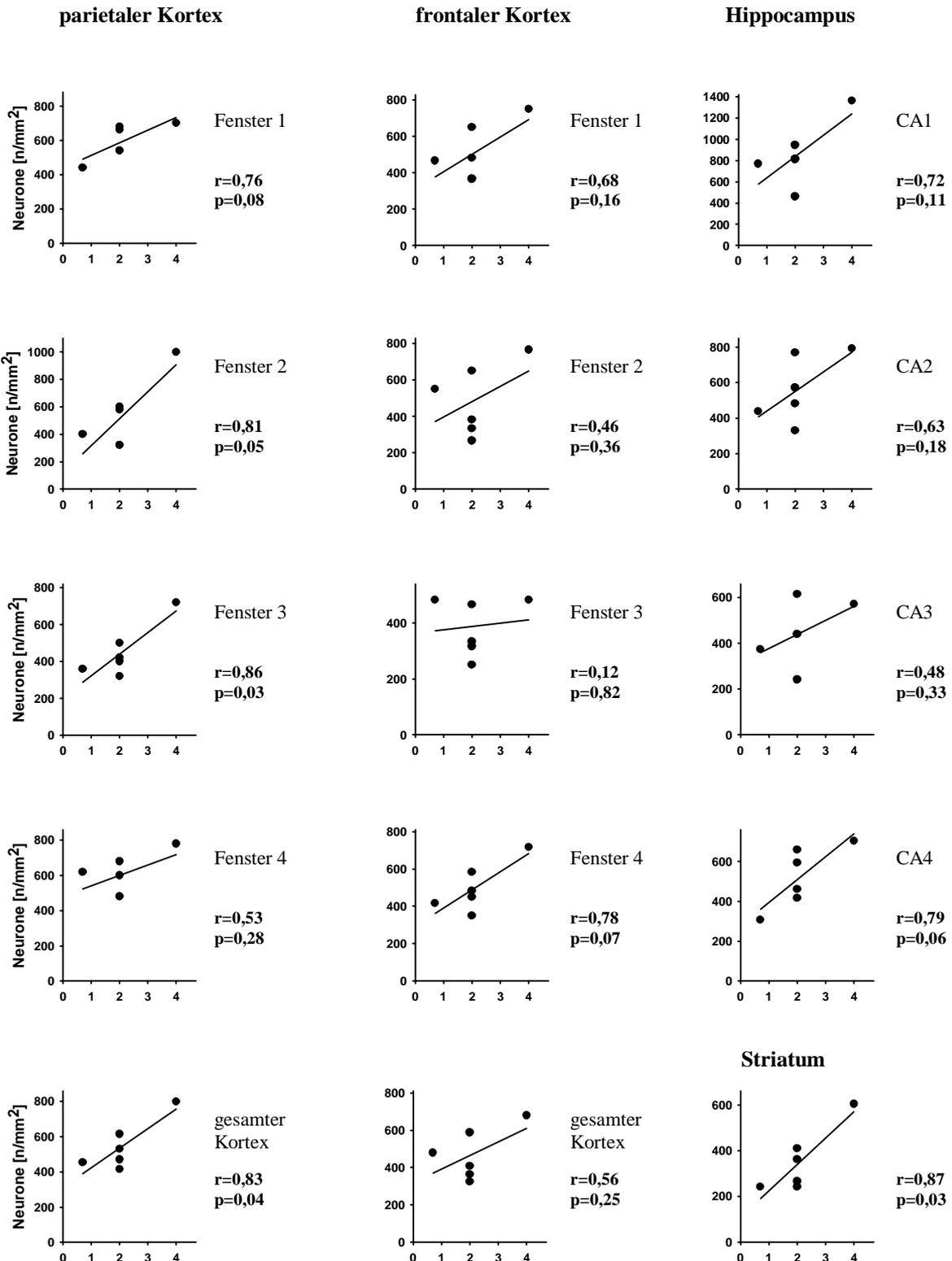


Abb. 41. Multiple Regressionsanalysen zwischen der Zahl adhärenter Zellen und überlebender Neurone im frontalen und parietalen Kortex (Fenster 1-4, einschließlich Mittelwert aller Messfenster), Hippocampus (CA1-4) und Striatum. Je mehr adhärenente Zellen in den Venolen der Hirnoberfläche gefunden wurden, desto höher war die Zahl überlebender Nervenzellen in fast allen Hirnstrukturen desselben Tiers. Dieser Trend erreichte zum Teil signifikantes Niveau.

3.3.2 Leukozyten-Endothelinteraktionen und neurologisches Defizit

Regressionsanalysen erbrachten keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Leukozytenaktivierung und dem neurologischen Score. Ebenso wenig konnte eine signifikante Korrelation mit dem Gewichtsverlust der Tiere nach Ischämie etabliert werden.

3.3.3 Schweregrad des ischämischen Nervenzellverlusts und des neurologischen Defizits

Die Prüfung, ob ein Zusammenhang zwischen dem Untergang von Nervenzellen durch Ischämie und dem neurologischen Defizit besteht, ergab eine statistisch signifikante, lineare Korrelation (Abb. 42). Moribunde Tiere mit großem neurologischen Defizit hatten demnach einen stärker ausgeprägten Nervenzellverlust im Kortex als überlebende Tiere mit besserer Erholung der Funktion. Der Verlust von Nervenzellen im Messfenster 2 der kortikalen Hirnrinde war mit dem Schweregrad des neurologischen Defizits besonders eng korreliert.

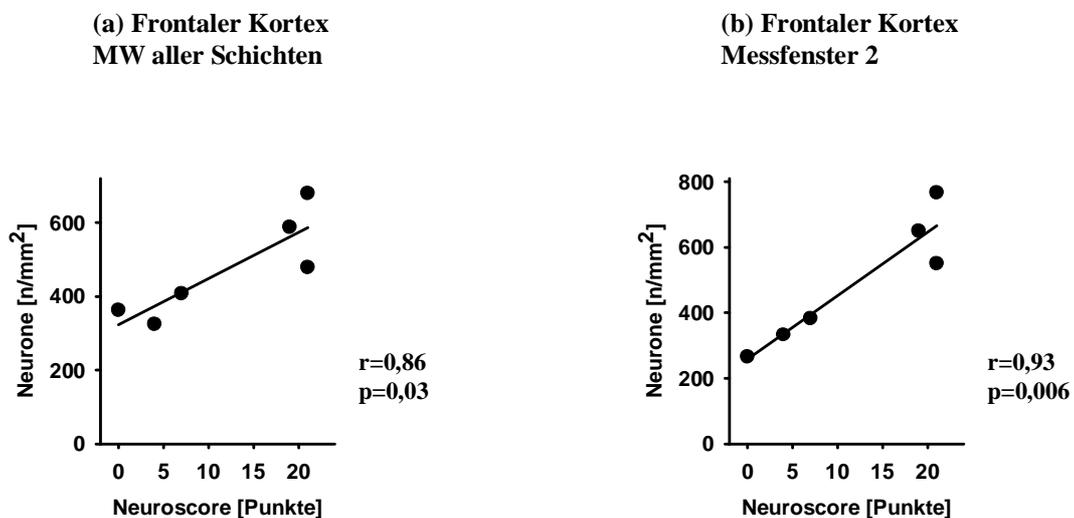


Abb. 42 Regressionsanalysen zwischen neurologischem Score und Anzahl überlebender Nervenzellen in allen Schichten des frontalen Kortex (a) und Messfenster 2 (b). Beide Analysen zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang: je mehr Nervenzellen überlebt hatten, desto besser war die neurologische Funktion dieser Versuchstiere bzw. desto weniger Ausfälle hatten sie.

Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Das experimentelle Modell

Es gibt verschiedene experimentelle Modelle, die klinischen Manifestationen der zerebralen Ischämie, i. e. global, hemisphärisch, multifokal, fokal etc. zu untersuchen (154). Außerdem kann der Beinträchtigung der Hirndurchblutung ein Verschluss oder eine Stenose auf arterieller oder venöser Seite zugrunde liegen. Bei der Wahl des Modells müssen diese Besonderheiten, ebenso die verschiedenen Methoden der Induktion einer Ischämie im Hinblick auf die interessierende Fragestellung berücksichtigt werden.

Eine globale zerebrale Ischämie betrifft definitionsgemäß das Gehirn in toto. Ursächlich kann (s. a. Einleitung) u. a. ein Herzstillstand z. B. aufgrund von Herzrhythmusstörungen sein. Eine globale Ischämie mit massiver arterieller Hypotension tritt auf bei einer verminderten Pumpleistung des Herzens z. B. wegen schwerer Herzinsuffizienz, durch Herzbeutelamponade oder durch Obstruktion der kardialen Ausstrombahn wie bei Herzklappenfehlern. Weitere Ursachen sind akute Einbußen des Herzzeitvolumens aufgrund eines verminderten venösen Rückstroms wie durch einen schweren Blutverlust mit Kreislaufschwäche (50). Im Experiment ist eine globale zerebrale Ischämie unterschiedlicher Dauer – von wenigen Minuten bis zu einer Stunde (102) – untersucht worden. Die resultierende Durchblutungsstörung kann durch eine mehr oder weniger vollständige Stase mit Reduktion der Perfusion auf 0-5% charakterisiert sein (83). Die Reperfusion des Gehirns nach Ischämie ist für dessen Überleben allerdings obligat.

Der ischämische Hirnschaden manifestiert sich mit zeitlicher Verzögerung u. a. durch einen selektiven Nervenzelluntergang – *selective neuronal death* – in besonders vulnerablen Hirnarealen (196). Cooper soll 1836 erstmals eine experimentelle zerebrale Ischämie induziert haben (161). Seither sind zahlreiche Versuche mit Ratten, Gerbils, Katzen, Kaninchen, Hunden, Schweinen, Primaten und anderen Wirbeltieren durchgeführt worden (83). Die Methoden zur Erzeugung einer globalen Verminderung oder Stillstands der Hirndurchblutung beinhalten u. a. eine Okklusion der großen Versorgungsarterien (Karotiden, Vertebralarterien, Aorta, Truncus brachiocephalicus), die Induktion eines Herzstillstands, die Strangulation der Halsgefäße durch eine pneumatische Krawatte, die Erhöhung des intrakraniellen Drucks durch die Infusion von künstlichem Liquor in die Hirnventrikel oder die Implantation und Inflation eines intrakraniellen Ballons. Es gibt auch Verfahren, die eigentlich keine Ischämie

sondern eine Hypoxie herbeiführen, z. B. die Reduktion von Sauerstoff in der Atemluft, dessen Ersatz durch Stickstoff bei der kontrollierten Beatmung (170;171;231) oder ein beidseitiger Pneumothorax (174;217).

Eine häufigere Manifestation ist die fokale zerebrale Ischämie, die bei schwerem Verlauf zum akuten thrombo-embolischen Hirninfarkt beim Menschen führt. Eine fokale Ischämie des Gehirns entsteht häufig durch temporäre oder permanente Okklusion der A. cerebri media, neuropathologisches Korrelat ist der Infarkt im Versorgungsgebiet dieser Arterie. Es sind zahlreiche tierexperimentelle Modelle einer fokalen Durchblutungsstörung des Gehirns entwickelt worden. Experimentelle Modalitäten beinhalten – meistens bei Ratten – Gefäßokklusion durch Elektrokoagulation, Klippen einer Arterie oder Einführung eines intraluminalen Fadens. Charakteristische Unterschiede zwischen der fokalen und globalen Ischämie sind u. a. die Dauer und der Schweregrad der Ischämie sowie die Erzeugung einer vitalen perifokalen Randzone um die ischämische Parenchymnekrose, der Penumbra. Eine zum Hirninfarkt führende fokale Ischämie kann permanent sein oder zeitlich begrenzt, z. B. 0,5-3 Stunden (83). Die Durchblutung im ischämischen Nekrosegebiet ist zwar stark reduziert, muss jedoch nicht sistieren. Je nach Ausbildung von Kollateralen kann eine Restdurchblutung von etwa 10-20% des Ausgangswertes vorhanden sein. Im Nekrose umgebenden Gebiet – der Penumbra (9;10) – ist die Durchblutung weniger stark abgefallen (auf etwa 20-40% des Ausgangswertes), es kommt aber zum Erlöschen der elektrischen Aktivität der Neurone. Das Parenchym der Penumbra ist jedoch – noch – vital. Charakteristika dieser Zone sind u. a. ein erhöhter Sauerstoffbedarf und Glukoseverbrauch, eine Gewebeazidose und das Auftreten von spontanen Depolarisationen – wie beim *Spreading depression*-Phänomen – mit allerdings angegriffenen Reserven von energiereichen Phosphaten (166). Die Überlebenschancen der Penumbra sind prekär, sie kann durch Ausdehnung des Infarkts ebenfalls untergehen oder sich wieder zu funktionsfähigem Hirngewebe mit intakter Durchblutung und Stoffwechsel regenerieren(97;100). Die Penumbra ist von großer klinischer Bedeutung durch die Möglichkeit, dieses Gewebe durch Methoden der Neuroprotektion und Wiederherstellen einer ausreichenden Durchblutung vor dem Untergang zu bewahren.

Die experimentelle Erforschung der *globalen* zerebralen Ischämie hat gleichwohl Bedeutung für das Verständnis des ischämischen Schlaganfalls durch *fokale* Ischämie des Gehirns. Bei Mensch und Tier wird nämlich in der Penumbra ebenfalls ein *verzögerter selektiver Nervenzelluntergang* beobachtet, als Manifestation des ischämischen Sekundärschadens, der bei der *globalen* Ischämie im Mittelpunkt der pathophysiologischen

Forschung steht. Bei einer nur 5-15-minütigen fokalen Ischämie mit Reperfusion (bei Ratten) durch reversible Okklusion der A. cerebri media kommt es nur zum selektiven Nervenzelluntergang im arteriellen Versorgungsgebiet. Eine Pannekrose – der Infarkt – entsteht erst ab 30-minütiger Unterbrechung der arteriellen Blutversorgung (136). Auch sonst gibt es Übereinstimmungen der pathophysiologischen Mechanismen der globalen und fokalen zerebralen Ischämie. Die globale Ischämie hat somit Bedeutung für die Aufklärung der Pathogenese als auch Entwicklung von Methoden der Neuroprotektion beim Schlaganfall, insbesondere der Penumbra (26).

4.1.2 Versuchstiere

Nagetiere, insbesondere Ratten, Mäuse und Gerbils, sind die für die Ischämieforschung am häufigsten verwendete Tierspezies. Sie haben durch Inzucht große Homogenität und einen hohen Grad genetischer Homologien zu höheren Säugern. Hinzu kommen Ähnlichkeiten der neuro-anatomischen Entwicklung, einschließlich vaskulärer Versorgung des Gehirns hauptsächlich durch 4 große Arterien. Die Nutzung von Kleintieren für diese Forschung ist verglichen mit den Menschen näher stehenden Katzen, Hunden oder Primaten weniger problematisch. Verfeinerte Methoden, einschließlich Benutzung des Operationsmikroskops, erlauben auch hier anspruchsvolle mikrochirurgische Präparationen trotz kleiner Körpergröße.

Die vorliegenden Experimente wurden mit Mongolischen Wüstenrennmäusen (Ordnung: Rodentia; Familie: Muridae; Genus Meriones; Spezies: unguiculatus) – Gerbils – durchgeführt, wobei folgende Eigenheiten dieser Spezies von Vorteil sind:

a) Die Unvollständigkeit des Circulus arteriosus Willisii. Perfusionsstudien haben ergeben, dass Gerbils keine Aa. communicantes posteriores haben (126;131). Es gibt lediglich kleine Arteriolen von 30-60 µm Durchmesser als insuffiziente Verbindung zwischen dem vertebro-basilären und dem durch die Aa. carotides versorgten Hirnkreislauf (132). Die arteriellen Gefäßbesonderheiten ermöglichen die Erzeugung einer nahezu vollständigen Ischämie des Großhirns durch Okklusion beider Halsschlagadern bei erhaltener Blutversorgung des Hirnstamms mit den Regulationszentren für Kreislauf und Atmung. Aufgrund dieser Besonderheit sind Gerbils für experimentelle Untersuchungen der globalen zerebralen Ischämie häufig eingesetzt worden (4;32;92;126;130;214).

b) Die Dura mater der durchschnittlich nur 60 g schweren Tiere ist äußerst dünn, der Subarachnoidalraum ist sehr schmal. Das ermöglicht die Intravitalmikroskopie der Hirnoberfläche nach Entfernung der Schädelkalotte zur Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation ohne eine gegebenenfalls traumatische Eröffnung der Dura mater. Untersuchungen bei Ratten mit Eröffnung der Dura haben gezeigt, dass bereits in der Kontrollperiode, *vor* Induktion einer Ischämie, eine Leukozytenaktivierung stattfindet (177). Daher kann vermutet werden, dass allein die Eröffnung der Dura mater Leukozyten aktiviert. Diese Problematik wird durch die Wahl von Gerbils aus o. g. Gründen umgangen. Weiterhin werden durch den Erhalt der Dura mater die Chancen verbessert, dass die Tiere nach dem Akutversuch eine längere Zeit (Tage) ohne Infektion überleben.

Das vorliegende Projekt betraf vor allem die Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation, das Zusammenwirken von Leukozyten und zerebralem Gefäßendothel, die Aktivierung von Entzündungsvorgängen, die Blut-Hirnschranke und die Makro- und Mikrohämodynamik des Gehirns (48). Diese Phänomene können nur mit einem Versuchstier *in vivo* untersucht werden. Alternative Methoden mit Zellkulturen oder isolierten Organen kamen nicht in Betracht.

4.1.3 Dauer der Ischämie

Die Halsschlagadern wurden für die vorliegenden Experimente für 15 min durch Ligatur blockiert. Diese Zeitspanne ist für klinische Notfälle, einen Herz-Kreislaufstillstand oder Kreislaufchock, relevant (22). Experimentelle Untersuchungen mit Gerbils haben gezeigt, dass die beidseitige Karotisokklusion von nur 3 min Dauer bereits einen histologisch sichtbaren Verlust von Nervenzellen in der CA3 Region des Hippocampus nach sich zieht (109). Eine globale zerebrale Ischämie von nur 2 min Dauer ist mit funktionellen Veränderungen auf zellbiologischer Ebene, beispielsweise der Hochregulation von Stressproteinen, vergesellschaftet, gegebenenfalls als Erklärung für die erhöhte Toleranz gegenüber einem nachfolgenden ischämischen Insult (ischämische Präkonditionierung) (175;236). Durch eine Ischämiedauer von 5-15 min kann das verzögerte Auftreten von Pyramidenzellverlusten in selektiv vulnerablen Arealen, wie der besonders empfindlichen CA1 Region des Hippocampus, zuverlässig nachgewiesen werden (83). Darüber hinaus kommt es zum Verlust von kleinen und mittelgroßen Nervenzellen im Striatum. Von

Pulsinelli (180) und Crain (47) wurde berichtet, dass solche Insultzeiten (5-10 min) auch im Kortex von Ratten und Gerbils zum verzögerten Nervenzelluntergang führen.

Unsere Arbeitsgruppe hat durch Weber und Stummer ausführliche Untersuchungen über die Morbidität und Mortalität von Gerbils nach globaler zerebraler Ischämie durchgeführt. Der Schweregrad des durch beidseitige Karotisokklusion für 15 min hervorgerufenen selektiven Nervenzelluntergangs war mit dem Überleben der Versuchstiere eng korreliert (234). Das Verhalten der Tiere nach Ischämie war auffallend verändert. Es kam zum Verlust von Körpergewicht als prognostisch signifikantes Überlebenskriterium (233). Die globale Ischämie von 15 min Dauer induzierte einen histologisch reproduzierbaren Hirnschaden, funktionelle Verhaltensdefizite und einen ausgeprägten Gewichtsverlust. Der Insult hat zwar eine Mortalität, erlaubt jedoch eine hochwirksame therapeutische Beeinflussung der Tiere, z. B. durch Gelegenheit zu vermehrter körperlicher Aktivität im Laufrad (213;214). Längere Ischämiezeiten hingegen erschweren die Differenzierung und Abgrenzung der verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen wegen der Schwere des Insults, wengleich Gerbils selbst eine 60-minütige bilaterale Karotisokklusion zumindest kurzfristig überleben (63).

4.1.4 Intravitalmikroskopie der zerebralen Mikrozirkulation

Die Intravitalmikroskopie sollte die Bedeutung der Aktivierung von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie aufklären. Wie die in Tab. 8 zitierten Untersuchungen zeigen, gibt es bisher nur *indirekte* Hinweise, die sowohl *für* als auch *gegen* die Beteiligung einer Leukozytenaktivierung am sekundären Hirnschaden bei der zerebralen Ischämie sprechen.

Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der zerebralen Ischämie				
Autor	Spezies	Modell	Therapie	Zielgröße
Hallenbeck 1986(93)	Hund	Luftembolie	-	Akkumulation von In ¹¹¹ -Leukozyten
DelZoppo 1991(53)	Primat	MCA-Okklusion Reperfusion	-	Histologie, Elektronen- mikroskopie
Okada 1994(168)	Primat	MCA-Okklusion Reperfusion	-	P-Selektine ICAM-1
Hudetz 1999(103)	Ratte	Karotisokklusion ICP-Anstieg	NO-Inhibitoren	Intravital- mikroskopie

Hemmversuche mit therapeutischer Wirkung				
Autor	Spezies	Modell	Therapie	Zielgröße
Bednar 1991(21)	Kaninchen	Embolie Hypotension	Anti-Leukozyten- Serum	Infarkt volumen
<i>Clark</i> 1991(44)	<i>Kaninchen</i>	<i>Aorta-Okklusion</i> <i>Reperfusion</i>	<i>CD-18 Antikörper</i>	<i>Neurologischer</i> <i>Status</i>
Bowes 1993(29)	Kaninchen	Emboli en Reperfusion	ICAM-1 Antikörper	Neurologischer Status
Conolly 1996(46)	Maus	MCA-Okklusion Reperfusion	ICAM-1 knock-out Mäuse	Neurologischer Status, Infarktgröße

Hemmversuche ohne therapeutische Wirkung				
Autor	Spezies	Modell	Therapie	Zielgröße
Aspey 1989(8)	Gerbil	Karotisokklusion	Cyclophosphamid	Farbstoffperfusion
<i>Schott</i> 1989(189)	<i>Hund</i>	<i>Herzstillstand</i>	<i>Leukozytendepletion</i>	<i>Neurologischer</i> <i>Status</i>
Clark 1991(43)	Kaninchen	Mikrosphären- Embolie	CD-18 Antikörper	Neurologischer Status
<i>Schürer</i> 1991(190)	<i>Ratte</i>	<i>4-Gefäß-Okklusion</i>	<i>Anti-Neutrophilen- Serum</i>	<i>Histologie</i>
Takeshima 1992(215)	Katze	MCA-Okklusion	Antikörper	Durchblutung, evozierte Potentiale, Infarkt volumen
<i>Dirnagel</i> 1994(59)	<i>Ratte</i>	<i>Karotisokklusion</i> <i>Hypotension</i>	<i>Leukozytendepletion</i>	<i>Neurologischer</i> <i>Status</i>

Kein Nachweis von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der zerebralen Ischämie				
Autor	Spezies	Modell	Therapie	Zielgröße
<i>Abels</i> 2000(2)	<i>Ratte</i>	<i>4-Gefäß-Okklusion</i>	-	<i>Intravital- mikroskopie</i>
Peters 1999(177)	Ratte	MCA-Okklusion	-	Intravital- mikroskopie
Villringer 1991(227)	Ratte		-	Konfokale- mikroskopie

Tab. 8 Untersuchungen über die Bedeutung der Leukozytenaktivierung für den ischämischen Hirnschaden. Die Befunde sind – je nach Modell und Versuchstierspezies – vor allem bei der globalen zerebralen Ischämie (kursiv dargestellt) widersprüchlich.

Die eigenen Untersuchungen sollten deshalb mit Hilfe der Intravitalmikroskopie das Ausmaß und die Kinetik der Leukozytenaktivierung vor, während und nach einer globalen zerebralen Ischämie erfassen. Das mehrtägige Überleben der Versuchstiere nach Ischämie sollte weitergehende Analysen von funktionellen und histologischen Parametern erlauben – auch für die Untersuchung möglicher Zusammenhänge.

Ein besonderer Vorzug der Intravitalmikroskopie ist die Sichtbarmachung des mikrovaskulären Systems. Die regionale Durchblutung und Mikrovasomotorik können

wiederholt auf quantitativer Ebene analysiert werden. Dem stereotypen Ablauf der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten mit Margination, Adhäsion und Migration (203) entsprechend ist es möglich, mit dem Endothel interagierende Zellen als *Roller* oder *Sticker* zu differenzieren. Ferner können durch die Intravitalmikroskopie funktionelle Parameter, wie die Kapillardichte oder eine Schädigung der Blut-Hirnschranke erfasst und im zeitlichen Verlauf zugeordnet werden. Die Präparation des Schädelfensters mit unversehrter Dura mater, zusammen mit der extrakraniellen, transitorischen und reversiblen Unterbindung der Karotiden, war die Voraussetzung, diese Experimente mit einem chronischen Modell, einschließlich längerem Überleben der Versuchstiere, durchführen zu können. Eine Untersuchung der Mikrozirkulation auf histologischer Basis mit Verwendung von Hirnschnitten wäre zwangsläufig mit der Tötung von Versuchstieren verbunden gewesen, ohne dass dynamische Veränderungen hätten erschlossen werden können.

Die *in vivo* Analyse des Hirnkreislaufs mit Hilfe eines geschlossenen Schädelfensters soll 1811 mit Untersuchungen von Ravina bei Hunden begonnen haben (184). Es folgten Untersuchungen mit Affen, Hunden, Katzen, und Kaninchen. Durch technische Verfeinerungen konnten nachfolgend auch kleinere Tiere wie Ratten oder Mäuse herangezogen werden (112). Die mikroskopische Beobachtung der Hirnoberfläche ist prinzipiell mit Durch- oder Auflicht möglich. Durch sorgfältige Analyse der zerebralen Mikrozirkulation nach Ischämie konnte Meyer 1958 eine Aktivierung von Leukozyten mit Schädigung der Blut-Hirnschranke und Störung der Durchblutung *qualitativ* beschreiben (149). Pawlik hat 1981 (176) Untersuchungsergebnisse über kortikale Kapillaren vorgestellt, Yamakawa 1987 (239) seine Beobachtungen über das Verhalten von weißen Blutzellen mit Durchlichttechnik bei Katzen mit hämorrhagischer Hypotension. Der Einsatz einer mikrochirurgisch in den Kortex vorgeschobenen Lichtquelle führte allerdings erwartungsgemäß zur Verletzung des Hirngewebes mit Eröffnung der Blut-Hirnschranke, Ödemextravasation, Mikroblutungen und vermehrter Wärmeproduktion.

Bei der in der vorliegenden Studie eingesetzten Auflichtmikroskopie treten diese Probleme nicht auf. Eine wichtige Komplikation der Präparation eines offenen Schädelfensters bei kleinen Versuchstieren ist die Herniation von Hirngewebe nach Eröffnung der Kalotte und Inzision der Dura mater. Aus diesem Grund werden intravitalmikroskopische Experimente bevorzugt mit einem geschlossenen Schädelfenster durchgeführt, wobei das eröffnete Fenster-Kompartiment durch Deckglas und Zahnzement oder Histoacryl versiegelt wird (157). Von Vorteil ist, dass durch Verschluss des Fensters der intrakranielle Druck gemessen werden kann. Uhl und Mitarbeiter (224;225) haben das geschlossene Fenster von Ratten dazu benutzt,

durch Kontrolle von Zu- und Abfluss, die Liquorhomöostase zu analysieren sowie durch Superfusion der exponierten Hirnoberfläche mit Pharmaka dadurch erzeugte Veränderungen der Mikrozirkulation zu untersuchen. Allerdings wurde von Olesen berichtet (169), dass es durch Eröffnung der Dura mater von Ratten schon nach kurzer Zeit (35 min) zur Eröffnung der Blut-Hirnschranke kommen kann. Die Neigung kleiner Versuchstiere nach Kraniotomie und Freilegung der Hirnobefläche eine Herniation des Gehirns zu entwickeln, wurde von Schürer bestätigt (112). Eine 10-minütige Senkung des Liquordruckes auf 0 mmHg, also Atmosphärenniveau, kann eine Eröffnung der Blut-Hirnschranke zur Folge haben. Zur Vermeidung des intrakraniellen Druckabfalls hat Schürer die Präparation des Fensters unter einer Paraffinölsäule durchgeführt. Das für die eigenen Untersuchungen bevorzugte *geschlossene* Schädelfenster beim Gerbil war hilfreich solche aufwendigen Präparationen zu vermeiden. Die Dura mater blieb geschlossen, eine Herniation des Gehirns fand nicht statt. Der Subarachnoidalraum blieb anatomisch intakt, die Superfusion des Gehirns mit künstlichem Liquor konnte entfallen, die Infektionsgefahr für die überlebenden Tiere war gemindert. Blutgefäße der harten Hirnhaut mussten nicht durchtrennt und kauterisiert werden. Nach Beendigung des Akutversuchs konnte die Galea durch einfache Naht verschlossen werden. Entscheidend war jedoch, dass durch diese Präparation keine Leukozyten aktiviert wurden. Eigene und andere Erfahrungen bei Tieren mit verletzter Dura mater (95) haben selbst bei nur geringfügiger Verletzung der harten Hirnhaut eine Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bestätigt.

Die konfokale Laser-scanning Mikroskopie ist eine Technik, die 1989 erstmals von Villringer (229) zur *in vivo* Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation von Ratten eingesetzt wurde. Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie hat diese Methode eine erheblich bessere Auflösung, außerdem dringt sie tiefer, *in vivo* bis zu 300 µm, in die Hirnrinde ein. Dadurch wird eine Analyse von Leukozyten-Endothelinteraktionen durch die intakte Dura mater hindurch ermöglicht. Das konnte unter anderem Pfister bei Ratten mit Pneumokokkenmeningitis demonstrieren (142). Gleichwohl sind die analytischen Möglichkeiten der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie durch das zeitliche Auflösungsvermögen begrenzt. Die Akquirierung eines Bilds mit voller räumlicher Auflösung dauert 1 s. Diese Zeit kann allerdings durch Verringerung der Bildpunkte auf 1/16 s reduziert werden. Für die Messung der mikrovaskulären Perfusion und Dynamik von Leukozyten-Endothelinteraktionen ist die herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie besser geeignet.

Als Indikator des Intravasalraums wurde hochmolekulares, Fluoreszein-markiertes Dextran (MW: 150.000 u) infundiert. Dadurch wurde die Blutviskosität nicht verändert (206).

Allerdings hat Dextran hemmende Eigenschaften auf Leukozyten-Endothelinteraktionen, verbessert die funktionelle Kapillardichte und könnte dadurch den ischämischen Gewebeschaden abschwächen, wie aus Untersuchungen mit Verwendung der Hamsterrückenhautkammer hervorgeht (207). Weiterhin ist Dextran als Radikal-scavenger wirksam (31), kann Adhäsionsmoleküle blockieren und eine Thrombozyten-vermittelte Leukozytenaktivierung hemmen als Hinweis seiner protektiven Eigenschaften bei Ischämie und Reperfusion. Diese Eigenschaften sind jedoch vom Molekulargewicht abhängig; das hier verwendete Dextran (150.000 u) ist nur gering protektiv wirksam (205). Eine Hemmung der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen oder eine Verbesserung der funktionellen Kapillardichte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die hier berichtete Aktivierung von Leukozyten bei der globalen Ischämie könnte deshalb eher unterschätzt als überbewertet werden.

Weiterhin ist unwahrscheinlich, dass Dextran einen Einfluss auf die Kapillarperfusion nach globaler Ischämie gehabt hatte. Durch Infusion von hier wirksamerem, niedermolekularem Dextran (60.000 u) ist die durch Ischämie beeinträchtigte funktionelle Kapillardichte in der Reperusionsphase verbessert, aber nicht normalisiert worden (206).

Für die methodisch bessere Fluoreszenzmarkierung von Leukozyten *in vivo* wurde Rhodamin 6G intravenös appliziert. Die *ex vivo* Markierung trägt das deutlich höhere Risiko einer extrakorporalen Aktivierung dieser Zellen mit Expression von Integrinen (94) und Veränderung ihrer rheologischen Eigenschaften (119;160). Baatz (12) haben 1995 berichtet, dass Rhodamin 6G bereits in einer Dosis von > 0,1 mg/kg bei Ratten, von > 0,2 mg/kg bei Hamstern oder von > 0,3 mg/kg bei Mäusen Granulozyten (99,9%), Monozyten (97,0%) und Lymphozyten (75,2%) größtenteils anfärbt. Nach 4 Tagen waren nach einmaliger Rhodamininjektion noch 94,1% der Granulozyten für den intravitalmikroskopischen Nachweis ausreichend gefärbt.

Anhand dieser Befunde kann bei den eigenen Experimenten vermutet werden, dass ein ausreichender Anteil von Leukozyten *in vivo* mit Rhodamin 6G angefärbt worden ist. Durch Wiederholung der Injektion wurde versucht, einen potenziellen Verlust des Indikators auszugleichen. Phototoxische Effekte und Ausbleichen der Indikatoren wurde durch zeitliche Begrenzung der Fluoreszenzlichtexposition der Hirnoberfläche vermieden (185). Die Beleuchtungszeit war auf 30 s pro Messgebiet beschränkt. Die interessierenden Parameter der Mikrozirkulation wurden offline analysiert. Mit Hilfe des computergesteuerten Mikrometertischs konnten identische *Regions of interest* zuverlässig wiedergefunden werden, ohne die Lichtexposition durch aufwendiges Suchen verlängern zu müssen. Die

hochempfindliche SITS-Restlichkamera erlaubte eine Anregungsbeleuchtung geringer Intensität. Der Erfolg dieser Bemühungen war daraus ersichtlich, dass Störungen der Blut-Hirnschranken-Funktion als empfindliches Symptom einer photochemischen Schädigung (151) in keinem Versuch aufgetreten sind.

Wegen der begrenzten Tiefenschärfe war es nicht möglich, in größeren Venolen ($>50\ \mu\text{m}$) alle rollenden oder frei fließenden Zellen zu erfassen, genausowenig eine simultane Darstellung der gesamten Endotheloberfläche dieser Gefäße. Aus diesem Grund ist die Häufigkeit von rollenden bzw. adhärenten Zellen als Zahl pro $100\ \mu\text{m}$ Gefäßsegmentlänge und Minute angegeben worden und nicht – wie häufig von anderen Autoren – als Zahl pro Gefäßoberfläche. Darum konnte auch kein Leukozytenflux oder der Mikroleukokrit berechnet werden.

4.1.5 Quantifizierung der zerebralen Durchblutung

Die Methoden zur Quantifizierung der Hirndurchblutung im Tierversuch sind vielfältig. Einige Verfahren basieren auf der Implantation von Indikatormesssonden, womit die regionale zerebrale Durchblutung (rCBF) gemessen wird. Dazu gehören Indikator-Auswaschmethoden z. B. die Wasserstoff- (11), (69) oder Heliumclearance. Die physikalischen Messprinzipien sind gleich: Nach Erreichen der gewünschten *Steady-state* Konzentration im Hirngewebe nach Applikation z. B. durch Beimengung in die Atemluft wird der Indikator – in Abhängigkeit von der Durchblutung – aus dem Hirngewebe ausgewaschen. Aus der Kinetik der mit der Sonde bestimmten Konzentrationsänderung wird die Durchblutung auf quantitativer Basis errechnet. Diese Methode gestattet multiple Messungen der regionalen Durchblutung in Maß und Zahl, macht allerdings eine das Gewebe u. U. verletzende Platzierung einer Sonde erforderlich (211). Die Bestimmung der Wärmeclearance (82) erlaubt eine *kontinuierliche* Messung der regionalen Durchblutung, erfordert jedoch auch die Implantation einer Gewebesonde. Mit Hilfe der ^{14}C -Autoradiographie (105;188) oder der Injektion von radioaktiven (98) oder fluoreszierenden (182) Mikrosphären kann die regionale Hirndurchblutung in vielen verschiedenen Arealen gleichzeitig gemessen werden. Diese Methoden sind gut standardisiert und ergeben absolute Werte (z. B. $\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{min}$), sie machen jedoch das Töten des Versuchstiers für die Aufbereitung des Gehirns erforderlich. Außerdem ist die Beschaffung und Handhabung radioaktiver Indikatoren teuer und mit Risiken verbunden.

Das geringe Volumen des Gehirns von Nagetieren, insbesondere vom Gerbil, macht den Einsatz von Magnetresonanztomographie, Positronenresonanztomographie (127) oder der $^{133}\text{Xenon}$ -Clearance (62) mit externer Messung der radioaktiven Strahlung so gut wie unmöglich. Für die Messung der *globalen Durchblutung* des Gehirns kommt die Stickoxydul-Clearancetechnik von Kety und Schmidt (115) in Betracht oder die Bestimmung des gesamten hirnvenösen Abfluss. Aufgrund der aufwendigen Präparation und der beschriebenen Aktivierung von Leukozyten sind diese und viele der o. e. Methoden jedoch ungeeignet.

Mit der Laser-Doppler-Fluxmetrie kann die regionale Durchblutung mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung kontinuierlich bestimmt werden. Dies haben 1975 Stern (209) und 1980 Williams und Stern (237) erstmals für das Gehirn gezeigt. Der entscheidende Vorzug ist, dass durch Platzierung der Sonde auf der Dura mater bzw. der Schädelkalotte Hirnparenchym nicht verletzt oder irritiert wird. Das Messvolumen (Hirnparenchym) ist etwa 1 mm^3 bei einer maximalen Eindringtiefe des Lasers von etwa 1,5 mm. Somit ist die Laser-Doppler-Fluxmetrie der zerebralen Mikrozirkulation, ebenso wie die Intravitalmikroskopie, auf die Hirnoberfläche beschränkt. Veränderungen der Durchblutung werden durch die Messung nicht erzeugt. Die Methode ist einfach, Bewegungsartefakte können durch Befestigung der Sonde mit einem Mikromanipulator auf ein Minimum reduziert werden. Bei Aufbringen der Sonde wird darauf geachtet, dass sich keine größeren, mit dem bloßen Auge sichtbaren Arteriolen und Venolen im Messfeld befinden. Borgos hat 1996 (28) berichtet, dass für Hirngewebe das physikalische Doppler-Prinzip beim Laser nur für Gefäße mit weniger als $200\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser gültig ist.

Limitierende Faktoren sind das Fehlen präziser Kenntnisse über das Parenchym-Messvolumen, die Abhängigkeit des Signals von den optischen Gewebeeigenschaften (z. B. Zelldichte, Wasser- oder Cytochromgehalt), Messfehler durch geringe räumliche Veränderungen und Unklarheit, von welchen Gefäßen der Mikrozirkulation das Signal ausgeht. Bisher ist es nicht gelungen das Verfahren zu eichen – also die Durchblutung in $\text{ml}/100\text{g Gewebe}\cdot\text{min}$ zu errechnen. Dirnagl hat aber (58) eine enge Korrelation ($r=0,91$) zwischen dem (relativen) LDF-Messwert und der durch Autoradiographie mit ^{14}C -Jodantipyrin quantitativ bestimmten Durchblutung des Gehirns von Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie erhalten. Eine signifikante Korrelation wurde auch durch Vergleich mit der radioaktiven Mikrosphärenmethode gefunden (118).

Die Intravitalmikroskopie erlaubt ebenfalls eine Beurteilung der regionalen Hirndurchblutung auf mikrovaskulärer Ebene. Durch Bestimmung von Gefäßdurchmesser und der Strömungsgeschwindigkeit von roten Blutkörperchen kann die Perfusion eines

Gefäßes quantitativ erfasst werden – mit Hilfe der funktionellen Kapillardichte die nutritive Versorgung des Gewebes (165). Wenn, wie in den vorliegenden Experimenten, die Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit nicht bestimmt werden kann, eignet sich ersatzweise die Messung der Strömungsgeschwindigkeit der im axialen Blutstrom fließenden Leukozyten. Pickelmann hat hierfür Piagefäße von Ratten mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht. Durch Bild-zu-Bild-Analyse der Videoaufnahmen hat er die Strömungsgeschwindigkeit von Leukozyten in Venolen bestimmt. Mit dieser Methode –*Image-tracking*– wird die Bewegung einer einzelnen Fluoreszenz-markierten Zelle über eine messbare Distanz in einer bestimmten Zeitspanne verfolgt (208). Die Grenze der zeitlichen Auflösung mit maximal 50 Halbbildern pro Sekunde war eine Fließgeschwindigkeit von etwa 2,5 mm/s; folglich war eine Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit in Arteriolen nicht möglich.

In den vorliegenden Versuchen mit Gerbils war es jedoch nicht möglich, die Strömungsgeschwindigkeit zu messen. Die Aufnahmequalität war nicht ausreichend, die zurückgelegte Strecke eines Leukozyten im Venolen-Zentralstrom durch Sequenzanalyse der Videobilder präzise zu bestimmen. Aus diesem Grund konnte die zeitliche Korrelationsmethode –*Dual-slit*– von Wayland und Johnson (232) per Videodensitometrie nicht angewendet werden.

Zusammengenommen war die Laser-Doppler-Fluxmetrie für die eigenen Untersuchungen der regionalen Hirndurchblutung, besonders in Kombination mit der Intravitalmikroskopie, die Methode der Wahl – auch für den Vergleich mit der arteriovenösen Transitzeit (AVTT).

In den vorliegenden Experimenten wurde die Durchblutung einzelner Gefäße der Hirnoberfläche durch die Bestimmung der AVTT eines injizierten Farbstoffbolus (Rhodamin 6G) ermittelt. Mit Hilfe der AVTT – als einfache Methode – sollte die Perfusion von Gefäßen in verschiedenen Regionen der Hirnoberfläche wiederholt und atraumatisch erfasst werden. Mit beiden Verfahren, Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) und AVTT, wurden vergleichbare Veränderungen der Durchblutung beobachtet. Beide Methoden ergänzen sich dadurch, dass mit Hilfe der LDF die Durchströmung von *Erythrozyten*, durch die arteriovenöse Transitzeit der *Plasma*-Flux bestimmt wird.

Die ausgeprägte Ischämie der Hirnrinde war von einer signifikant erhöhten postischämischen Durchblutung gefolgt; diese fiel anschließend wieder ab und erreichte 3 Stunden nach Ischämie den Ausgangswert vor Ischämie. Die Ergebnisse der AVTT-Messung waren mit denen der Laser-Doppler-Fluxmetrie hochsignifikant ($p < 0,001$) korreliert; es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,751 und eine Steigung der

Regressionsgeraden von 0,96 errechnet, als Hinweis für den direkten linearen Zusammenhang der Befunde beider Methoden. Aus dem Vergleich dieser Methoden ging außerdem hervor, dass die von Rovainen (186) vorgeschlagene Differenz-Integral-Methode ein einfaches intravitalmikroskopisches Verfahren ist, um Veränderungen der Hirndurchblutung zu berechnen. Ihre Vorteile sind u. a die Unabhängigkeit des Ergebnisses von der Menge, Art und Injektionsgeschwindigkeit des Farbstoffbolus. Als limitierend für den Vergleich der beiden Methoden muss angemerkt werden, dass die beidseitige Karotisokklusion beim Gerbil zwar Veränderungen der Hirndurchblutung in großer Variabilität induziert, eine gezielte Erniedrigung oder Erhöhung der Durchblutung in vielen kleinen Schritten allerdings nicht möglich war. Weiterhin ist festzustellen, dass die Laser-Doppler-Fluxmetrie zwar durch den Vergleich mit anderen Verfahren validiert worden ist, jedoch die Hirndurchblutung damit nicht quantitativ, sondern relativ bestimmt werden kann.

Zur Eignung der arteriovenösen Transitzeit kann abschließend gesagt werden, dass ihre Validierung mit einer Referenzmethode zur Quantifizierung der Durchblutung (z. B. ^{14}C -Jodantipyrin Autoradiographie oder radioaktive Mikrosphären) noch aussteht. Dessen ungeachtet sind die in diesen Versuchen hierzu erhaltenen Regressionsanalysen vielversprechend.

4.1.6 Neurologische Untersuchung

Sterblichkeit und neurologisches Outcome sind die wichtigsten Prüfkriterien der meisten klinischen Studien über zerebrale Ischämie (26). In vielen experimentellen Untersuchungen hingegen stehen die Infarktgröße und das Ausmaß des selektiven Nervenzelluntergangs ersatzweise im Vordergrund. Es ist schon lange bekannt, dass, vermutlich wegen der komplexen funktionellen Anatomie des Zentralnervensystems des Menschen, kein direkter Zusammenhang zwischen Infarktausdehnung und resultierender Behinderung besteht. Kleine Läsionen mit strategisch wichtiger Lokalisation wie Capsula interna können schwerste Defizite wie motorische Lähmungen oder Sprachstörungen erzeugen mit Verlust von Mobilität, Arbeitsfähigkeit und Kommunikation sowie lebenslänglicher Abhängigkeit und Pflegebedürftigkeit der Betroffenen. Läsionen des Hippocampus, eine für die globale Unterbrechung der Hirndurchblutung besonders empfindliche Struktur, sind oft mit gravierenden Störungen der Gedächtnisfunktion verbunden, die eine selbständige Lebensführung unmöglich machen. Andererseits sind selbst größere Verluste von Hirngewebe

im Frontallappen unter Umständen nur durch eingehende neuropsychologische Testung zu erkennen. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Pharmakotherapie bei der zerebralen Ischämie haben ergeben, dass eine morphologische Protektion des Gehirns mit geringeren funktionellen Defiziten vergesellschaftet sein kann (24;55;111). Dessen ungeachtet gibt es auch Befunde über morphologische Protektion ohne entsprechende Minderung von Verhaltensdefiziten (199) oder umgekehrt, eine Protektion der Funktion ohne Abschwächung des Gewebes Schadens (153); ergo, nicht alle durch Ischämie hervorgerufenen Defizite müssen ein histopathologisches Äquivalent haben (25). Die Diskrepanz von Ergebnissen mit vielen im Tierversuch neuroprotektiv wirksamen Substanzen und ihrer bisher enttäuschenden klinischen Wirksamkeit (52) wird auch auf die oft nur unzureichende Bewertung von funktionellen Defiziten bei ihrer experimentellen Testung zurückgeführt. Diese Erfahrungen machen deutlich, wie wichtig ergänzende funktionelle Untersuchungen für tierexperimentelle Studien zur Neuroprotektion sind.

Die tägliche Erhebung des Neuroscores nach Testprotokoll war einfach und schnell durchführbar. Mit den einzelnen Testaufgaben (Material und Methoden, Tab. 3) wurde die Funktionstüchtigkeit verschiedener anatomischer Strukturen, einschließlich ihrer afferenten und efferenten, Verbindungen geprüft (223).

Die Gleichgewichtsprüfung auf der schiefen Ebene gilt der Testung von Pons und Mesencephalon. Für Greifreflexe (Fremdreflexe) ist ein intaktes motorisches Areal des Kortex erforderlich, ebenso für das Strecken der Vorderpfoten. Ausrichtreflexe (Pons und Mesencephalon) sind das Drehen des Kopfes entgegen dem vom Untersucher gebeugten Rumpf und das Umdrehen aus der Rückenlage. Der Fallreflex prüft wiederum Kortex unter Einbeziehung der Sehbahn. Medulla, Pons und Medulla oblongata werden mit den Korneal- und Pinnareflexen geprüft. *Circling* oder Haltungsanomalien des Rumpfs weisen eine Hemiparese nach, sind aber weniger zu Lokalisation eines Defizites geeignet. Die spontane lokomotorische Aktivität (Spontanmotilität) ist u. a. stark von der Integrität des Hippocampus abhängig (85), während speziesspezifische Aktivitäten wie Nagen von Pappe nur die globale Integrität des Zentralnervensystems prüfen helfen.

Nach einer globalen zerebralen Ischämie ist ein Gewebeschaden zunächst nur für das direkt betroffene Großhirn zu erwarten. Sekundäre Mechanismen wie die Verminderung der Blutzufuhr wegen eines ischämischen Hirnödems können den Schaden jedoch auf tiefere Strukturen des Gehirns ausdehnen. In einem zunächst verschonten Kerngebiet, das üblicherweise durch efferente wie afferente Bahnen mit einem anderen – ischämisch geschädigtem – Kerngebiet verbunden ist, kann es sekundär durch transsynaptische

Degeneration zum Untergang von Neuronen kommen (216). Die neurologische Prüfung bezog daher Pons, Mesencephalon und Medulla oblongata ein.

4.1.7 Histologie

Um reproduzierbare Aussagen über den ischämischen Schaden nach Insult treffen zu können, wurden überlebende Neurone in vulnerablen Arealen wie Hippocampus, Striatum und Kortex lichtmikroskopisch quantifiziert. Die hierfür nötigen Schritte wie Fixation, Entnahme und Einbettung des Gehirns, einschließlich Schneiden und Färben, können jedoch Artefakte erzeugen und dadurch zu falschen Schlussfolgerungen führen. Schlecht fixierte histologische Schnitte haben sogenannte *dark neurons* oder *red neurons* als typischen Artefakt, i. e. dunkle, geschrumpfte Zellkerne, die morphologisch hyperchromatischen Nervenzellkernen ähneln, die nach Beschreibung von Garcia und Eke (66) im Endstadium der ischämischen Zellschädigung gefunden werden. Die Perfusionsfixation des Gehirns der Tiere nach einem von Brown und Brierley 1968 (30) erstmals beschriebenen Verfahren mit Paraformaldehyd verbessert erheblich die Qualität des histologischen Präparats im Vergleich zur Immersionsfixation. Von Eriskat wurde die Perfusionsfixation durch Verwendung einer 4% Paraformaldehydlösung und Verlängerung der Perfusion auf mindestens 20 min bei konstantem Druck verfeinert (67). In histologischen Schnitten des Gehirns von intrakardial perfusionsfixierten Gerbils *ohne* ischämischen Insult (Kontrolltiere) wurden keine *dark neurons* gefunden.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Hirnschnitte mit Kresyl-Violett nach der klassischen Methode von Nissl zur Beurteilung von Neuronen gefärbt. Crain hat bei Gerbils mit globaler zerebraler Ischämie (47) beobachtet, dass die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin oder die Silber-Imprägnation zu vergleichbaren Ergebnissen bei der Analyse des selektiven Nervenzelluntergangs führt. Für die Zählung von Nervenzellen wurde eine von Stummer (214) beschriebene Methode übernommen, unter Berücksichtigung der von Garcia (77), Eke (66) und Eke und Conger (65), etablierten morphologischen Vitalitätskriterien für Neurone (Material und Methoden, Tab. 4). Bei Fehlen nur eines der einfach erkennbaren Vitalitätsmerkmale wurde eine Zelle als avital klassifiziert. Zur Erhöhung der Zuverlässigkeit wurde in regelmäßigen Abständen und zu Beginn der Auszählung von vitalen Nervenzellen ein digitalisierter, gespeicherter histologischer Standardschnitt des Gehirns mit als lebend bzw. avital markierten Zellen am Computerbildschirm ausgezählt. Mit Hilfe von

neuroanatomischen Orientierungspunkten wurden die Messfenster eines Schnitts exakt positioniert. Die Verwendung eines stereotaktischen Atlas der ZNS-Histologie vom Gerbil (143) erleichterte das Erkennen und Auffinden zentraler Kerngebiete und Bahnen; die im Atlas angegebene Entfernung der frontalen Schnitte zum Bregma in rostro-kaudaler Richtung half bei der Auswahl der Präparate. Kirino (117) hat bestätigt, dass ischämische Veränderungen sich über den gesamten dorsalen Bereich des Hippocampus ausdehnen. Wie Kirino (116) erstmals gezeigt hat, ist der Untergang selektiv vulnerabler Nervenzellen ein Prozess, der eine gewisse Zeit (in seiner Untersuchung 3 Tage) benötigt. Um das gesamte Ausmaß der Nervenzellschädigung zu erfassen, wurden die Versuchstiere erst am 4. Tag nach Ischämie perfusionsfixiert.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Kontrollparameter

Der Narkosedauer von insgesamt etwa 6 Stunden ungeachtet blieb der arterielle Blutdruck als Zeichen der Verträglichkeit von Anästhesie einschließlich Dosierung stabil. Der deutliche Blutdruckanstieg kurz nach Karotisokklusion kann als eine Reaktion zentraler Kreislaufzentren auf die Verminderung der zerebralen Durchblutung aufgefasst werden; ein Blutdruckanstieg ist auch bei anderen Experimenten über die globale zerebrale Ischämie bei Mongolischen Wüstenrennmäusen beschrieben worden (213). Andererseits ist bei den Tieren mit globaler Ischämie in der Reperfusionphase keine Veränderung des Blutdrucks festgestellt worden. Systemische Schwankungen des Blutdrucks können somit für die Veränderungen der Hirndurchblutung nicht verantwortlich gemacht werden.

Aufgrund des geringen Blutvolumens von Wüstenrennmäusen (etwa 4 ml) waren wiederholte arterielle Blutentnahmen für die Blutgasanalyse nicht möglich. Eine durch Blutgasanalyse kontrollierte Beatmung war deshalb ausgeschlossen und die in separaten Versuchen gefundene systemische Azidose der narkotisierten Tiere konnte nicht behandelt werden. Die Kontrollversuche (ohne Ischämie) ergaben jedoch keine dadurch hervorgerufenen Veränderungen des arteriellen Gefäßdurchmessers an der Hirnoberfläche oder der zerebralen Durchblutung, also von Variablen, die sehr sensitiv auf eine Veränderung des Blut-pH reagieren. Ein signifikantes Vorkommen von Leukozyten-Endothelinteraktionen fand bei Kontrolltieren, der Azidose ungeachtet, ebenfalls nicht statt.

Daher konnte angenommen werden, dass die – unvermeidbare jedoch mäßige – systemische Azidose wesentliche Zielgrößen des Experiments nicht beeinflusst hat.

Das Absinken der Hämoglobinkonzentration beruhte vermutlich auf dem perioperativen Blutverlust in Verbindung mit einer Blutverdünnung durch die Infusion von physiologischer Kochsalzlösung. Allerdings war die Hämoglobinkonzentration am Versuchsende nur um 14% verringert, zu einer ausgeprägten Anämie kam es nicht.

Der Anstieg der Leukozytenzahl von 10 auf 19 Zellen/nl, fast eine Verdopplung, im peripher-venösen Blut kann als Folge des operativen Eingriffs und der Narkose erklärt werden. Diese Veränderung trat bei den Tieren der Kontrollgruppe auf. Gleichwohl hat *ohne* ischämischen Insult des Gehirns eine Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen nicht stattgefunden. Deshalb wäre die Erklärung, dass Leukozyten allein aufgrund ihrer vermehrten Zahl im Blut häufiger mit Gefäßendothel interagieren, nicht stichhaltig.

Wegen der bekannten pathophysiologischen Bedeutung der Hyperglykämie für die Verstärkung des sekundären Hirnschadens bei der zerebralen Ischämie (Laktazidose des Gehirns) wurde der Blutglukosespiegel bestimmt (197). In den vorliegenden Untersuchungen blieb die Glukosekonzentration allerdings im physiologischen Bereich; Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht.

4.2.2 Zerebrale Durchblutung

Die bilaterale Karotisokklusion ruft bei Gerbils eine ausgeprägte zerebrale Ischämie hervor. Die massive Abnahme der Durchblutung der Großhirnrinde konnte durch Laser-Doppler-Fluxmetrie bestätigt werden. Mit Blockade der Aa. carotides communes sank der Doppler-Flux innerhalb weniger Sekunden auf 19% des Ausgangswerts und blieb bis zur Beseitigung der Schlinge um die Karotiden auf diesem Niveau. Zur Beurteilung der Laser-Doppler Befunde müssen allerdings die physikalischen Grundlagen der Methode berücksichtigt werden, u. a. weil selbst bei völliger Stase kein Nullwert erreicht wird. Brown'sche Molekularbewegungen erzeugen, auch bei Stillstand der Perfusion, ein Doppler-Signal, das Flux vortäuscht. Selbst ein (toter) Gerbil ohne Kreislauf oder Atmung (Bewegungsartefakte) hat bei Zimmertemperatur einen Fluxwert von etwa 2-4% der normalen Rindendurchblutung des Gehirns. Dieser Wert – *Biological zero* – erhöht sich auf 9-14%, wenn Atembewegungen simuliert werden.

Die eigenen LDF-Ergebnisse stimmen mit autoradiographischen Durchblutungsmessungen beim Gerbil überein (110), wonach eine globale Ischämie von 2 min Dauer zum Absinken der Hirndurchblutung auf <5% des Kontrollwerts führt. Beginn der Ischämie konnte in den eigenen Experimenten intravitalmikroskopisch bestätigt werden. Es waren nur atemabhängige Bewegungen der Blutsäule in den Arteriolen und Pendelbewegungen, auch mit Flussumkehr, in den Venolen zu erkennen.

Im weiteren Verlauf der Experimente war das auch in anderen Untersuchungen (150;210) bei der globalen zerebralen Ischämie gefundene Durchblutungsverhalten – eine unmittelbar postischämisch auftretende Hyper- und anschließende Hypoperfusion des Gehirns – zu beobachten. Wenngleich diese Reaktion bei jedem *einzelnen* Versuchstier gefunden wurde, waren die jeweiligen Maxima und Minima der LDF-Werte von Tier zu Tier zeitlich versetzt. Deshalb wichen – nach Berechnung der Mittelwerte – weder die initiale Durchblutungszunahme noch die spätere Abnahme der Tiere mit Ischämie von den Tieren der Kontrollgruppe statistisch signifikant voneinander ab. Die postischämischen Durchblutungszunahme- und -abnahmen jedes *einzelnen* Versuchstiers wurden deshalb auf ihren höchsten bzw. niedrigsten Wert analysiert unter Berücksichtigung des Auftretens der Durchblutungsmaxima bzw. -minima. Daraus ging hervor, dass die Hirndurchblutung 14 ± 2 min nach Beginn der Reperfusion signifikant erhöht hingegen nach 66 ± 17 min signifikant vermindert war.

Die postischämische Hyperperfusion des Gehirns sofort nach Insult wird u. a. durch Akkumulation vasodilatatorischer Substanzen, einschließlich saurer Metabolite (z. B. Milchsäure) mit Verlust der Autoregulation der Widerstandsgefäße erklärt (113). Durch die danach verzögert einsetzende Hypoperfusion des Gehirns kommt es erneut zur Hypoxie mit Verminderung des Substratangebots an das vorgeschädigte Hirngewebe, das jedoch einen erhöhten Sauerstoffbedarf hat (161). Die postischämische Hypoperfusion ist daher ein wichtiger Mechanismus des sekundären Hirnschadens bei der zerebralen Ischämie. Dieses Konzept wird durch Befunde von Hossmann bei Katzen (102) und Affen (27;101) gestützt. Das Überleben von Versuchstieren mit langer globaler zerebraler Ischämie von einer Stunde Dauer war nur dann gewährleistet, wenn die postischämische zerebrale Durchblutung nicht beeinträchtigt war.

Zu den Mechanismen der in diesen Versuchen verzögert aufgetretenen Minderperfusion gibt es keine klaren Hinweise. Der arterielle Blutdruck und die arteriellen Gefäßweiten waren unverändert, schieden daher als Ursache der Durchblutungsabnahme aus. Es wurden keine Kapillaren gefunden, die von Leukozyten längerfristig verlegt bzw. dadurch mangelhaft

perfundiert waren. Auch eine Verringerung von mit Rhodamin 6G perfundierten Kapillaren (i. e. Kapillardichte) war nicht zu sehen. In den postkapillären Venolen wurde in der Phase der maximalen Hypoperfusion nach Ischämie keine Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen beobachtet. Im übrigen ist unwahrscheinlich, dass die späte Leukozytenaktivierung die Durchblutung beeinträchtigt hat, ohne dass auch nur eine einzige Venole verlegt worden ist (89). Obwohl gegen Ende der intravitalmikroskopischen Beobachtungen mehr Roller und Sticker gefunden wurden, war die Perfusion zu diesem Zeitpunkt bereits wieder erhöht.

Auch aggregierte Thrombozyten sollen in der Lage sein, die Mikrozirkulation nach globaler Ischämie zu behindern (42;61). Im Blut strömende Thrombozyten können ebenfalls durch Rhodamin 6G intravital gefärbt werden (228). Adhärente Blutplättchen oder größere Thrombozytenaggregate wurden intravitalmikroskopisch jedoch nicht gefunden (144). Die im Fenster sichtbaren Abschnitte des Gefäßbaums – präterminale Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen – waren in der Reperfusionphase unverändert durchblutet. Eine Störung der Mikrozirkulation durch Gefäßokklusion – entweder mit weißen Blutzellen, Plättchen oder Plättchen-Aggregaten – war so gut wie ausgeschlossen.

Darüberhinaus gehende Vermutungen über die der Hypoperfusion zugrunde liegenden Mechanismen könnten eine massive Erhöhung der Blut-Viskosität durch intra-extravasale Flüssigkeitsverschiebung (z. B. in Endothelzellen) betreffen oder eine sonstwie hervorgerufene Endothelzellschwellung mit Einengung des kapillären Lumens (5). Nach zerebraler Ischämie sind tatsächlich vesikuläre Protrusionen von Endothelzellen in das Kapillarlumen als mögliches Strömungshindernis beobachtet worden (40). Geschwollene Fortsätze von Astrozyten können Mikrogefäße des ischämischen Parenchyms komprimieren und dadurch die Durchblutung beeinträchtigen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Chopp mit Hilfe der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie bei Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie durch Embolisierung haben ergeben, dass Astrozyten Mikrogefäße derart einengen können, dass ihre Durchblutung absinkt (247;248).

In den eigenen Experimenten kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine ausgeprägte, durchblutungswirksame Verengung von Arterien und Arteriolen vorhanden war, die allerdings mit Hilfe der Intravitalmikroskopie nicht nachweisbar war, weil die Hirngefäße der Schädelbasis oder im Parenchym bzw. tiefen Hirnwindungen betroffen waren bzw. Arteriolen mit einem Durchmesser $> 100 \mu\text{m}$. Wegen des limitierten Auflösungsvermögens konnten die Durchmesser von Kapillaren nicht bestimmt werden. Dennoch kann eine Einengung des Kapillarlumens keine große Rolle gespielt haben, weil die funktionelle Kapillardichte

unverändert und die Passage von Erythrozyten und Leukozyten durch Kapillaren nicht behindert war.

Ein weiterer, bedeutsamer Mechanismus der postischämischen Hypoperfusion ist die ischämische Hirnschwellung mit Anstieg des intrakraniellen- und Hirngewebedrucks. Wenngleich der intrakranielle Druck nicht gemessen wurde, spricht die Einengung postkapillärer Venolen in dieser Phase für den Aufbau eines erhöhten perivaskulären Gewebedrucks. Allerdings könnte ein Strömungshindernis auf Kapillar- oder Arteriolenenebene mit Abnahme der Durchblutung auch zur Verringerung des venolären Blutvolumens geführt haben.

Ames und Mitarbeiter haben 1968 eine Störung oder Ausbleiben der postischämischen Reperfusion in Abhängigkeit von der Ischämiedauer beschrieben (5). Bei Versuchstieren (Kaninchen) mit nur 15 min globaler zerebraler Ischämie war die Reperfusion des Gehirns (Tusche-Füllung der Gefäße) bei bis zu 95% der histologisch geprüften Areale des Gehirns unvollständig oder nicht vorhanden. Als Mechanismus dieses *no-reflow* bezeichneten Phänomens wurde eine Erhöhung des Gefäßwiderstands durch eine perivaskuläre Zellschwellung postuliert, mit Verlegung des Lumens für zelluläre Blutbestandteile. Kapillaren-verlegende-Leukozyten – *Plugger* – sind von Hallenbeck 1986 (93) bei der fokalen zerebralen Ischämie postuliert und von Del Zoppo (53) elektronenmikroskopisch – jedoch in einer Häufigkeit von nur 4,7% der Kapillaren eines ischämischen Hirnareals – gefunden worden.

Für die Bewertung dieser Befunde müssen die Unterschiede der pathogenetischen Mechanismen der fokalen und globalen zerebralen Ischämie (s. o., Kapitel 4.1, und Einleitung) berücksichtigt werden. Im übrigen sind Zweifel berechtigt ob 4,7% verlegte Kapillaren pathophysiologisch strömungsrelevant sind. Ames hat keine näheren Angaben über die physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen seiner *no-reflow* Beobachtungen gemacht, z. B. über den exakten Beginn und die Dauer der Tusche-Perfusion oder den arteriellen Blutdruck der Versuchstiere (s. o.) in dieser Phase. Die mangelhafte Tuschefüllung und -darstellung der Hirngefäße könnte gegebenenfalls durch ein lokales Gefäßtrauma im Halsbereich durch eine bis auf 350 mmHg aufgeblasene Halsmanschette hervorgerufen worden sein. Im übrigen konnte Ames später diese Ergebnisse nicht reproduzieren (71). De la Torre kam nach eigenen Untersuchungen zur globalen zerebralen Ischämie bei Ratten zu dem Schluss, dass das *no-reflow* Phänomen ein postmortem Artefakt sei. Ames hatte die Tusche erst nach Herzstillstand der Tiere mit einem künstlich aufrechterhaltenen Druck arteriell infundiert. Bei Untersuchungen mit intravenös infundierter

Tusche bei schlagendem Herzen und normaler Herz-Kreislauffunktion war das *no-reflow* Phänomen nicht aufgetreten (49).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann gefolgert werden, dass die Aktivierung von Leukozyten durch die 15-minütige globale zerebrale Ischämie an der Beeinträchtigung der postischämischen Durchblutung des Gehirns *nicht* beteiligt gewesen ist.

Sofort nach Ischämie auftretende Störungen der Perfusion wurden nicht gesehen. Die Messung der Hirndurchblutung mit Laser-Doppler-Fluxmetrie ergab 5 min nach Beginn der Reperfusion normale Werte der Durchblutung. Intravitalmikroskopisch konnte beobachtet werden, dass die Reperfusion der Gefäße prompt nach Beseitigung der Karotisokklusion in Gang kam; Kapillaren blockierende Leukozyten wurden nicht nachgewiesen.

4.2.3 Neuroscore und Nervenzelluntergang

Ein wichtiger Gesichtspunkt von Untersuchungen der zerebralen Ischämie betrifft den Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des Nervenzellverlusts und dem neurologischen Defizit (242). Die Hemmung des selektiven Nervenzellschadens bei der globalen Ischämie durch Neuroprotektion ist mit einer Verbesserung des funktionellen Outcomes assoziiert (25;26). Auch in den vorliegenden Untersuchungen war das Ausmaß des Nervenzelluntergangs mit den durch den Neuroscore erfassten Störungen signifikant korreliert. Diese Korrelation war besonders eng beim Vergleich der überlebenden Neurone im zweiten Kortexfenster, das viele Pyramidenzellen enthält. Ein Zusammenhang zwischen dem ischämischen (histologischen) Hirnschaden und dem funktionellen Outcome ist mehrfach bestätigt worden – als Indiz für die Eignung der hier ausgewählten histologischen und funktionellen Parameter. Die Analyse des ischämischen Nervenzelluntergangs wurde am Tag 4 nach Ischämie durchgeführt. Kürzere Überlebenszeiten sind problematisch, z. B. weil unspezifische Narkosefolgen die Erhebung des Neuroscores beeinflussen könnten. Bei der fokalen zerebralen Ischämie ist gezeigt worden, dass die Infarktaudehnung und das Outcome ab Tag 4 (nach Ischämie) besser miteinander korrelieren als nach dem 2. Tag (242). Eine besondere Erwähnung verdient die nach der globalen Ischämie beim Gerbil gefundene Hypermobilität (108;124;125). In der vorliegenden Studie wurde die motorische Aktivität jedoch nicht systematisch, z. B. durch Laufraduntersuchungen, aufgezeichnet. Von großer

prognostischer Bedeutung hingegen war die reduzierte motorische Spontanaktivität, z. B. bei Tieren mit Beeinträchtigung der Vigilanz, die häufig ein schlechtes Outcome hatten.

4.2.4 Mechanismen der ischämischen Zellschädigung

Glutamat-Exzitotoxizität – Kalzium

Eine führende pathophysiologische Mediatorfunktion hat die exzitatorische/exzitotoxische Aminosäure Glutamat (18). Mit Eintritt der Ischämie kommt es zur terminalen Depolarisation von Neuronen und Gliazellen; gleichzeitig, oder kurz vorher, werden große Mengen von Glutamat in den Extrazellulärraum freigesetzt. Die resultierende extrazelluläre Akkumulation, u. a. aufgrund des Versagens der Glutamat-Clearance durch die Glia, bewirkt eine Überstimulation von metabotropischen und Ionenkanäle-steuernden Glutamat-Rezeptoren, vor allem des AMPA- und NMDA-Typs, mit massivem intrazellulärem Einstrom von Ca^{++} - und Na^+ -Ionen. Eine Folge des möglicherweise daraus entstehenden, anhaltenden Ca^{++} -Overloads ist u. a. die Aktivierung von lipolytischen und proteolytischen Enzymen, die Bildung freier Radikale, der Abbau von DNS sowie eine massive Zellschwellung als Mechanismen der Zellschädigung (249). Gewebe-Plasminogen Aktivator und die Aktivierung von extrazellulären proteolytischen Proteinen sollen ebenfalls an der Schädigung der Zellen durch die Exzitotoxizität mitwirken (221;222). Insgesamt gilt die durch Glutamat vermittelte Exzitotoxizität, das dadurch hervorgerufene intrazelluläre Ca^{++} -Overload, als ein Schlüsselmechanismus des ischämischen Nervenzelltods (17). Beleg hierfür sind unzählige experimentelle *in vivo* Befunde bei der zerebralen Ischämie, wonach durch Applikation von spezifischen wie unspezifischen Glutamatrezeptorantagonisten die Entwicklung des sekundären Hirnschadens eindrucksvoll gehemmt bzw. abgeschwächt werden kann (113).

Azidose

Die Entstehung der Gewebeazidose durch die zerebrale Ischämie wird heute umfassend verstanden, weniger ihre pathophysiologische Bedeutung. Durch den Ausfall der oxidativen Energiegewinnung aufgrund des O_2 -Mangels im Gewebe kommt es zur Aktivierung der anaeroben Glykolyse, ein wenig suffizientes Verfahren der ATP-Synthese. Das Stoffwechselendprodukt, die Milchsäure, akkumuliert im nicht oder kaum durchbluteten

Hirngewebe als Ursache der Azidose. In Abhängigkeit von der aktuellen Blutglukosekonzentration kommt es zur Ansäuerung des Hirngewebes mit Absinken des Gewebe-pH auf 6,4–5,6 (195). Der saure pH begünstigt in der Reperfusionphase mit erneuter Anlieferung von Sauerstoff die Oxidation von Lipiden, von DNS und von Proteinen über die verstärkte Freisetzung von dreiwertigem Eisen (Fe^{III}), das die Synthese von freien Radikalen katalysiert (Haber-Weiss-Reaktion: (1) $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ und (2) $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{OH} + \text{OH}\cdot$). Der Befund, dass eine präischämische Hyperglykämie den sekundären Hirnschaden nach einer fokalen und globalen Ischämie massiv vergrößern kann, wird mit der Verstärkung der Gewebeazidose durch die dadurch erhöhte Milchsäurebildung erklärt (138). Nachteilige Auswirkungen der Hyperglykämie durch Verstärkung der Gewebsazidose werden auch beim selektiven Nervenzellschaden nach einer globalen zerebralen Ischämie beobachtet (137). Zudem ist die Milchsäureazidose ein wichtiger Mechanismus der ischämischen Zellschwellung (17). Untersuchungen von Staub haben gezeigt, dass die Schwellung und irreversible Schädigung von Gliazellen mit dem Schweregrad der Azidose zunimmt (204).

Freie Radikale

Freie Radikale sind äußerst reaktionsfreudige Moleküle mit ungepaarten, freien, Elektronen, die v. a. Doppelbindungen von Fettsäureseitenketten attackieren, aber auch Proteine denaturieren und DNS schädigen können. Ihre Mediatorfunktion bei der Entstehung des ischämischen Zellschadens ist schon lange vermutet worden (194) und konnte vielfach bestätigt werden (36;139). Die Anwesenheit von Sauerstoff ist Bedingung für die Produktion von freien Radikalen. Deshalb erfolgt ihre Bildung bevorzugt in der Phase der Rezirkulation nach einer globalen Ischämie. Vermutlich liegt dem Reperfusionsschaden nach Ischämie v. a. eine überschüssige Bildung von freien Radikalen zugrunde (145). Freie Radikale können Gewebe nicht nur direkt schädigen, sondern wirken auch als Entzündungsmediatoren mit Aktivierung zahlreicher Gene durch Vermittlung von Redox-sensitiven Transskriptionsfaktoren wie NF- κ B. Nachdem in der Frühphase nach Ischämie bereits erhöhte Konzentrationen von freien Radikalen im Gewebe vorhanden sind, wird ihnen eine Schlüsselrolle für die nachfolgende Entzündungskaskade zugesprochen. Eine wichtige Quelle von freien Radikalen sind im Gewebe akkumulierende aktivierte Leukozyten (36;139).

Periinfarktdepolarisation

Nach einer Ischämie oder nach anderen Insulten kann es zur Massendepolarisation von Nerven- und Gliazellen kommen, die sich wellenförmig über die Hirnrinde ausbreitet – an der Veränderung des Gleichstrom-Potenzials erkennbar. In der Nachbarschaft eines Infarkts sind im Tierversuch, diesem Vorgang entsprechend, sog. Periinfarktdepolarisationen beobachtet worden. Für die Erholung des Membranpotenzials dieser Zellen nach Depolarisation wird metabolische Energie zur Wiederherstellung der extra-/intrazellulären Ionengradienten benötigt, der mangelhaften Durchblutung des Gewebes ungeachtet (57). Bei weiterhin erhöhten extrazellulären Konzentrationen von K^+ -Ionen und der exzitatorischen Aminosäuren kann es allerdings wegen des versagenden Energiestoffwechsels zu wiederholten Depolarisationen mit fatalen Konsequenzen kommen (99). Im Experiment ist gezeigt worden, dass ein ischämischer Infarkt in Abhängigkeit von der Zahl von Depolarisationswellen wachsen kann (13). Der Beitrag dieses, bei der fokalen zerebralen Ischämie in der Penumbra eines Infarkts ablaufenden Vorgangs zum sekundären Hirnschaden bei der globalen zerebralen Ischämie ist hingegen nicht geklärt. Bei der fokalen zerebralen Ischämie ist bekannt, dass die therapeutisch-pharmakologische Hemmung der Periinfarktdepolarisation die Infarkt-ausehnung abschwächt.

Apoptose

Zellen des Gehirns und anderer Organe gehen nach einem Insult nicht nur durch Nekrose zugrunde. Ein weiterer Mechanismus ist die Apoptose, ein genetisch gesteuertes Selbstmordprogramm. Es ist unter anderem charakterisiert als aktiver, energieabhängiger Prozess, durch Erhalt der Zellmembran und typischer Fragmentierung von DNS mit Ausbleiben einer Entzündungsreaktion des Gewebes (3;7;68;218). Wenngleich der Beitrag der Apoptose für den ischämischen Parenchymuntergang nach wie vor unklar ist, erscheint ihre Hemmung, wegen ihres verzögerten Einsetzens, vielversprechend. Deshalb könnte therapeutisch nutzbare Zeit für Interventionen zur Verfügung stehen (*Window of opportunity*). Aus Experimenten mit präziser Differenzierung von globaler und fokaler sowie permanenter und transitorischer Ischämie gehen jedoch Hinweise hervor, dass die Apoptose bei der *globalen* zerebralen Ischämie entgegen ursprünglicher Erwartungen keine oder nur eine untergeordnete Rolle für den Untergang von selektiv vulnerablen Nervenzellen spielen soll. Li et al. haben Inhibitoren von Caspasen, den Schlüsselenzymen der Apoptose, eingesetzt,

womit sie zwar die Infarktausdehnung nach einer transitorischen fokalen zerebralen Ischämie, nicht jedoch den selektiven Zelluntergang im CA1 Sektor des Hippocampus bei Ratten mit globaler zerebraler Ischämie hemmen konnten (135). Auer und Mitarbeiter haben über 40 000 Neurone licht- und elektronenmikroskopisch analysiert, v. a. im Hippocampus nach globaler Ischämie beim Gerbil. Dabei fanden sie, nach unterschiedlich langen postischämischen Intervallen, nicht ein einziges Neuron, das die morphologischen Kriterien der Apoptose erfüllt (45). Aufgrund dieser sorgfältig ermittelten Ergebnisse kann vermutet werden, dass der selektive Nervenzelltod nach globaler zerebraler Ischämie beim Gerbil eine verzögerte Form der klassischen Nekrose darstellt.

Entzündungsreaktion

An der Entzündungsreaktion im Gehirn nach Ischämie sind nicht nur aus dem Blut einwandernde Leukozyten beteiligt – auf die gesondert eingegangen wird –, sondern auch Zellen des Hirnparenchyms, – die Mikroglia. Nach einem globalen ischämischen Insult kommt es innerhalb eines Tages zur Aktivierung von Mikrogliazellen, besonders dort, wo der selektive Nervenzelluntergang am stärksten ausgeprägt ist (107). Vermutungen über die Bedeutung der Mikrogliaaktivierung für den sekundären Hirnschaden fußen auf Untersuchungsergebnissen vom Gerbil, dass eine Blockade von Mikroglia durch Minozyklin oder Doxyzyklin eine Hemmung des Untergangs selektiv vulnerabler Nervenzellen um bis zu 75% gewährleistet (241).

Thrombozyten/Gerinnungssystem

Für die Infarktstehung beim Schlaganfall ist häufig ein thrombotischer/embolischer Verschluss einer Arterie des Gehirns verantwortlich. Dies erscheint für Hirnarterien als funktionelle Endarterien offensichtlich, zumindest bei längerer Dauer eines Verschlusses. Darüberhinausgehend gibt es jedoch Befunde die für eine Beteiligung von therapeutisch beeinflussbaren pathophysiologischen Mechanismen des Gerinnungssystems, einschließlich Thrombozyten, sprechen. Die Aktivierung der Gerinnung beim ischämischen Insult kann weitere Gefäßverlegungen nach sich ziehen, v. a. von Mikrogefäßen, z. B. Kapillaren, *distal* vom Hinderniss (Thrombus/Embolus) derjenigen Hirnarterie, deren Verschluss für den Insult zunächst verantwortlich war. Solche Mikrothrombosen können nach proximal und distal wachsen, sich im Gefäßverlauf also ausdehnen (246). Dieser Vorgang ist nicht auf die akute

Verschlussphase der initialen Ischämie begrenzt, sondern kann auch nach Einsetzen der Reperfusion, z. B. nach Lyse eines obstruktiven Thrombus, als fortlaufende disseminierte mikrovaskuläre Thrombosierung weiter schwelen (42). Folglich ist eine Durchblutungsstörung nicht notwendigerweise mit der Beseitigung der Gefäßobstruktion, der Ligatur der Halsschlagadern in den vorliegenden Experimenten, oder Lyse eines Thrombus (spontan oder medikamentös) vorüber. Im Gegenteil, eine Mangeldurchblutung nach initialem Insult kann längere Zeit bestehen bleiben bzw. ihr Ausmaß kann sogar zunehmen.

Experimentelle Untersuchungen bei der fokalen zerebralen Ischämie haben sowohl eine Ablagerung von Fibrin (167), als auch von Plättchen (54;156) in den Mikrogefäßen des postischämischen Parenchyms ergeben, offenbar mit einer Bevorzugung der Reperusionsphase (42). Zhang und Mitarbeiter machen diese Bildung von Thromben, aus Fibrin, Plättchen, Leuko- und Erythrozyten für die postischämische mikrovaskuläre Minderperfusion (*Misery perfusion*) verantwortlich. Sie konnten bei ihren Untersuchungen einen Perfusionsausfall auf kapillärer Ebene distal von einem Fibrinthrombus beobachten (248). Fibrin könnte zudem eine Mediatorfunktion für die Eröffnung der Blut-Hirnschranke haben, Thrombozyten aktivieren, die ihrerseits Leukozyten aktivieren und toxische Mediatoren freisetzen. Die Hemmung des Gerinnungssystems *nach* fokalem ischämischen Insult verringert den sekundären Hirnschaden (41;42). Endothelzellen verschieben durch hypoxische Exposition das pro-/antikoagulatorische Gleichgewicht in Richtung Thrombosedisposition (128;240). Es ist allerdings nicht geklärt, ob die Aktivierung von Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung bei der zerebralen Ischämie an der verzögerten postischämischen Hypoperfusion beteiligt ist (Abschnitt 4.2.2.). Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte nicht die Bedeutung des Gerinnungssystems bei der globalen zerebralen Ischämie aufgeklärt werden, wenngleich die Intravitalmikroskopie und quantitative Analyse der Mikrozirkulation Rückschlüsse zulassen. Zumindest wurden durchblutungseinschränkende Thrombosen oder Gefäßverschlüsse an der Hirnoberfläche nicht gefunden. Im Gegenteil, die funktionelle Kapillardichte blieb über den gesamten experimentellen Beobachtungszeitraum unverändert, alle sichtbaren präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen waren stets perfundiert, größere zelluläre Aggregate wurden intravitalmikroskopisch nicht beobachtet. Dies schließt nicht aus, dass intravasale Gerinnung und Thrombosierung von Hirnmikrogefäßen zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten sind.

Hirnödem

Das ischämische Hirnödem ist primär eine zytotoxische Schwellung von Nerven- und Gliazellen, zu dem im weiteren Verlauf eine vasogene Komponente hinzutritt. Die Zellschwellung an sich muß nicht notwendigerweise Folge einer Schädigung sein, sondern könnte auch als Wiederherstellung der Homöostase des Intra- und Extrazellulärums interpretiert werden (19). Dessen ungeachtet kann eine dadurch hervorgerufene Hirnschwellung Durchblutungsstörungen des Gehirns verstärken und zur Herniation führen, wie Shaw und Mitarbeiter bei an Hirninfarkten verstorbenen Patienten 1959 gezeigt haben (193).

Das vasogene Hirnödem durch eine fokale zerebrale Ischämie mit Eröffnung der Blut-Hirnschranke ist auf eine Extravasation von Plasmaproteinen und Wasser zurückzuführen und stets mit dem Untergang von Hirnparenchym vergesellschaftet (219). Hingegen ist bei der *globalen* zerebralen Ischämie von kurzer Dauer nicht bzw. nicht primär mit einer Störung der Blut-Hirnschranken-Funktion zu rechnen (16). In den eigenen Versuchen war 3 Stunden nach der (15-minütigen) Gefäßokklusion die Blut-Hirnschranke selbst für einen niedermolekularen Indikator (Natriumfluoreszein) undurchlässig. Hinweise für ein zytotoxisches Hirnödem, z. B. eine perivaskuläre Vakuolisierung als Indiz der Schwellung von Astrozytenfortsätzen, konnten in den histologischen Schnitten des Gehirns nicht entdeckt werden. Neuere Befunde über die Kainat-Läsion des Hippocampus von Mäusen deuten darauf hin, dass der selektive Nervenzelluntergang und die Schädigung der Blut-Hirnschranke voneinander unabhängige Ereignisse sind (39). Die Infusion von Plasma in das Interstitium des Hirnparenchyms hatte keine neurotoxischen Folgen.

Leukozyten

Aktivierte Leukozyten haben vielfältige Mechanismen Gewebe zu zerstören. Man kann direkt toxische Wirkungen im Gewebe, z. B. durch freie Radikale, von der Beeinträchtigung der Mikrozirkulation unterscheiden. Abb. 43 zeigt als Konzept eine Übersicht diverser Mediatoren, wie freie Radikale, Chemokine, proteolytische Enzyme, die von aktivierten Leukozyten gebildet und freigesetzt werden und eine Rolle beim sekundären Hirnschaden spielen können. In Tab. 10 sind durch weiße Blutkörperchen hervorgerufene Pathomechanismen zusammengefasst, die an der Störung der Mikrozirkulation des Gehirns unter pathophysiologischen Bedingungen beteiligt sind. Die genannten intravasalen

Phänomene, nicht aber eine Akkumulation von Leukozyten im Gewebe, sind der intravitalmikroskopischen Beobachtung zugänglich und lassen sich quantifizieren.

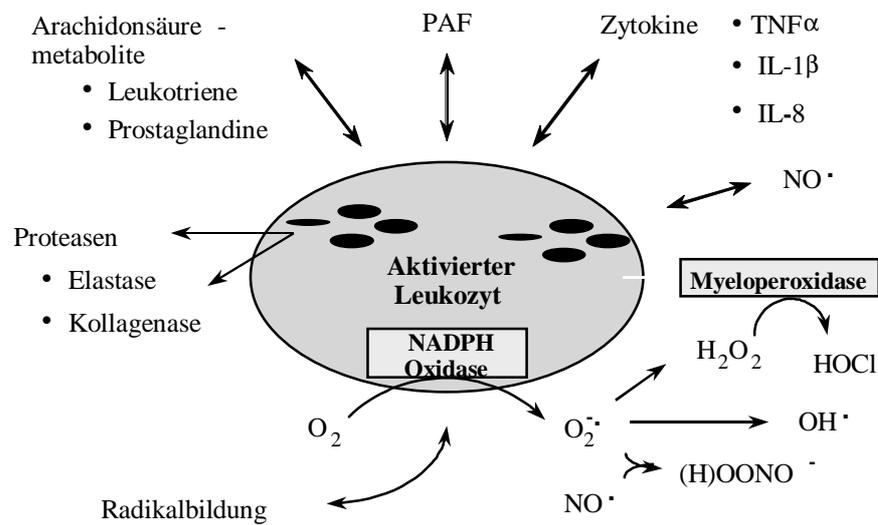


Abb. 43 Pathophysiologische Mechanismen eines aktivierten Leukozyten mit Bildung und Freisetzung einer Vielzahl von potenziellen Mediatoren des sekundären Hirnschadens nach Ischämie. Diese Faktoren können Gewebe entweder direkt schädigen oder nach weiterer Metabolisierung Teil einer Kaskade sein. Einige Mediatoren verstärken durch Rückkopplung die Aktivierung von Leukozyten (durch Doppelpfeile dargestellt).

Störung der Mikrozirkulation durch intravasale Pathomechanismen
Verlegen – <i>plugging</i> – von Kapillaren durch Blutzellen
Verlegen von Venolen durch Blutzellenaggregate
Aktivierung des Gerinnungssystems mit Bildung von Thromben,
Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten
Erhöhung der Blutviskosität
Endothelschwellung mit Bildung von Protrusionen und Schwellung von Mikrovilli
Kompression von Gefäßen z. B. durch das ischämische Hirnödem

Tab.10 Störungen der Mikrozirkulation durch intravasale Pathomechanismen bei der zerebralen Ischämie

In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie kein isoliertes Phänomen ist, sondern eine Komponente der komplexen Entzündungsreaktion, die durch vielfältige, z. T. redundante Feedback-Zyklen verstärkt oder gegebenenfalls gedämpft wird.

4.2.5 Leukozyten-Endothelinteraktionen

In diesen Untersuchungen konnte zum ersten Mal intravitalmikroskopisch beobachtet werden, dass die globale zerebrale Ischämie zur Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen in postkapillären Venolen (in der frühen Reperfusionphase) führt. Die quantitative Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg der Häufigkeit von rollenden und an der Gefäßwand adhärenen Leukozyten. Bereits 5 min nach Einsetzen der Reperfusion hatte die Zahl von rollenden Zellen zugenommen, nach 60 min war ihr Anstieg statistisch signifikant, nahm sogar in der 3-stündigen Beobachtungszeit weiter zu. Mit gewisser Verzögerung, nämlich 2 Stunden nach Beginn der Reperfusion, war die Häufigkeit von an der Gefäßwand fest adhärenen Zellen ebenfalls signifikant erhöht.

Um den weiteren Verlauf untersuchen zu können wurde, die späte Reperfusionphase, i. e. 6 und 7 Stunden nach Beginn der Rezirkulation einbezogen. Selbst 6 Stunden nach Reperfusionbeginn war die Häufigkeit von rollenden und adhärenen Zellen bei den Versuchstieren mit Karotisokklusion, im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Ischämie, noch signifikant erhöht. Eine Stunde später nahm die Häufigkeit von Leukozyten-Endothelinteraktionen wieder ab. Dieses Ergebnis spricht für eine zeitliche Begrenzung der Leukozytenaktivierung auf die Frühphase der Reperfusion nach globaler zerebraler Ischämie. Das Maximum von rollenden und adhärenen Zellen dürfte demnach 3-6 Stunden nach Ende der Ischämie erreicht sein.

Die Befunde zeigen weiterhin ein unterschiedliches, voneinander unabhängiges Verhalten von Leukozytenaktivierung und Hirndurchblutung. Während die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen stetig zunahm, war die Hirndurchblutung in dieser Phase durch eine Hyper- und anschließende Hypoperfusion gekennzeichnet. Wie durch Regressionsanalysen bestätigt worden ist, hatte die postischämische Aktivierung von Leukozyten keinen Einfluss auf die Mikrozirkulation des Gehirns in dieser Phase. Umgekehrt kann ausgeschlossen werden, dass Leukozyten allein wegen Verlangsamung ihrer

Fließgeschwindigkeiten in der Phase der Hypoperfusion mit der Gefäßwand häufiger interagiert haben.

Davon abgesehen wurden keine Veränderung der venolären Vasomotorik als Indiz einer Zu- oder Abnahme der Durchblutung gefunden. Die Durchmesser von Venolen waren zu keiner Zeit gegenüber dem Ausgangswert vor Karotisokklusion oder gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe signifikant verändert. Aus diesem Grund konnte aus den Regressionsanalysen kein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und den Gefäßkalibern hergestellt werden.

Für die Interpretation der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und ihrer Bedeutung für Störungen der Mikrozirkulation müssen auch die Fließeigenschaften von Blut und die auf Blutzellen wirksamen physikalischen Kräfte berücksichtigt werden. Mit Hilfe der Scherrate γ kann die mechanische Kraft geschätzt werden, die strömendes Blut auf einen adhärennten Leukozyten ausübt. Nach Newton (37) kann sie annähernd ermittelt werden als:

$$\gamma = \frac{V_{mean}^{\mu}}{D} \cdot 8 \cdot \eta$$

Bei gleichbleibender Viskosität η ist die Scherrate nur von der mittleren Strömungsgeschwindigkeit V_{mean}^{μ} und dem Gefäßdurchmesser D abhängig. Unter der Annahme, dass der Mikrohämatokrit unverändert bleibt, ist das Laser-Doppler-Signal (bei konstanten Gefäßdurchmessern) ein Maß für die mittlere Erythrozytengeschwindigkeit und damit der mittleren Strömungsgeschwindigkeit. Die Befunde der Durchblutungsmessung mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie und die intravitalmikroskopische Durchmesserbestimmung ermöglichen also Rückschlüsse auf die Scherrate. Zusammengenommen kann daraus gefolgert werden, dass die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen in den postkapillären Venolen von 15–60 μm Durchmesser unabhängig von den nach globaler zerebraler Ischämie herrschenden Strömungsverhältnissen erfolgt ist. Die Messung des Mikrohämatokrit bzw. der Blutviskosität war in das Versuchsprotokoll nicht einbezogen und kann demnach für die Berechnung der Scherraten nicht berücksichtigt werden. Ein entsprechender Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien, wonach die Scherrate bzw. Scherkraft als ein entscheidender Faktor für die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen identifiziert worden ist (70;134), kann deshalb nicht angestellt werden. Für die Interpretation muss weiterhin berücksichtigt werden, dass eine Aussage, ob die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen ober- oder unterhalb des kritischen

Scherraten-Schwellenwerts (133) von 400/s stattgefunden hat, nicht möglich ist. Schließlich spricht das Fehlen von Leukozyten-Endothelinteraktionen in Arteriolen gleichen Durchmessers bei niedriger (z. B. während Ischämie), mit Venolen vergleichbarer Durchströmung gegen einen Scherraten-abhängigen Mechanismus von Rollen und Adhärenz von Leukozyten. Niedrige Scherraten finden sich bevorzugt bei Gefäßbifurkationen und in Gefäßbereichen, wo laminäre durch turbulente Strömung ersetzt ist. Eine Prädilektion für die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen ist in solchen Gefäßabschnitten jedoch nicht beobachtet worden; sie wurden auch in geraden Segmenten von postkapillären Venolen ohne Verzweigung gefunden. Zusammenfassend kann deshalb die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen – in Übereinstimmung mit den Befunden anderer *in vivo* und *in vitro* Experimente – wegen Strömungsverlangsamung mit Absinken der Scherraten als unwahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Eine durch das experimentelle Vorgehen hervorgerufene Akkumulation von Leukozyten (Methode der Ischämie, Implantation des Schädelfensters) war in den vorliegenden Untersuchungen ebenso unwahrscheinlich. Im Vergleich zu anderen experimentellen Methoden der fokalen oder globalen Ischämie ist die extrakranielle Unterbindung der Halschlagadern mit einem feinen monofilen Faden viel schonender als die Eröffnung der Schädelkalotte zur Gefäßklippung, die Eröffnung des Thorax zur Unterbindung der hirnersorgenden Gefäße oder weitere eingreifende Maßnahmen, wie z. B. arterielle Hypotension durch Hämorrhagie, von der Traumatisierung des Endothels durch intraluminale Gefäßmanipulationen abgesehen. Ein wichtiger Vorteil ist, dass im Gegensatz zu den vielen anderen Untersuchungen, die Dura mater intakt geblieben ist. Die fehlende Aktivierung von Leukozyten bei Kontrolltieren ohne Ischämie bzw. Versuchstieren *vor* Karotisokklusion spricht für die schonende chirurgische Präparation in den eigenen Experimenten.

Durch intravitalmikroskopische Untersuchungen der zerebralen Mikrozirkulation von Ratten konnte Abels, im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, keine Induktion von Leukozyten-Endothelinteraktionen in der Reperfusionphase nach einer globalen zerebralen Ischämie (20 min Dauer) beobachten (1). Für diese sorgfältigen Untersuchungen wurde das Vier-Gefäß-Okklusions Modell nach Pulsinelli (179) verwendet. Der dadurch erzielte Schweregrad der zerebralen Ischämie wurde allerdings nicht durch Messung der Hirndurchblutung geprüft. Gütekriterium für den Eintritt der zerebralen Ischämie war das isoelektrische EEG, das bei allen für die Studie ausgewerteten Tieren innerhalb der ersten Minute erkennbar wurde (84). Dazu muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass die elektrische Aktivität des Gehirns frühzeitig bei Absinken der Hirndurchblutung erlischt, ohne

dass es gleich zur irreversiblen Schädigung von Nervenzellen kommen muss (10). Ratten verfügen, im Gegensatz zu Gerbils, über einen kompletten Circulus arteriosus Willisii. Deshalb ist prinzipiell bei diesen Tieren eine Kollateralversorgung des Gehirns durch die A. spinalis anterior möglich (56). Aus diesem Grund kann eine Restdurchblutung während der 20-minütigen Ischämiephase nicht ausgeschlossen werden. Im übrigen hatte Abels bereits in der präischämischen Kontrollphase rollende und adhärente Zellen in den Gefäßen der Hirnoberfläche beobachten können. Dennoch wurden in den Venolen 2 adhärente Zellen (pro 100 µm und Minute) in der Kontrollphase gefunden, ein Wert, der beim Gerbil in der postischämischen Phase – im Vergleich zur präischämischen Kontrolle – bereits statistische Signifikanz erreicht hätte. Die bei den Ratten schon vor Ischämie auftretende Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen könnte dadurch die weitere Aktivierung nach Ischämie verschleiert haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von Leukozyten in der Kontrollphase durch die Eröffnung der Dura mater verursacht wird.

In Anbetracht der Kinetik der Aktivierung von Leukozyten bei Wüstenrennmäusen – die Zahl von rollenden Zellen war erst nach 60 min, von adhären Zellen erst nach 2 Stunden Reperfusion signifikant erhöht – könnte weiterhin vermutet werden, dass der für die Versuche mit Ratten gewählte Beobachtungszeitraum von 2 Stunden nach Ischämie für den Aktivierungsprozess von Leukozyten-Endothelinteraktionen zu kurz war. Die in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeicherten P-Selektine haben zwar als sofort verfügbare, präformierte Adhäsionsmoleküle eine (147) wesentliche Funktion für das frühe Rollen von Leukozyten nach einem Stimulus (79), aber das Protokoll für die intravitalmikroskopische Beobachtung von 2 Stunden könnte für die Aktivierung anderer Adhäsionsmoleküle mit nukleärer Aktivierung, Transkription und Translation, z. B. von ICAM zu kurz gewesen sein. Zhang (245) und Mitarbeiter haben über Ratten mit MCA-Okklusion berichtet, dass die Expression von endotheliale ICAM erst nach 2 Stunden Reperfusion bzw. 4 Stunden nach Beginn der Ischämie signifikant erhöht war. Für die Deutung der Ergebnisse von Abels ist außerdem eine mögliche Präkonditionierung des Gehirns in Betracht zu ziehen mit Erhöhung der Ischämietoleranz durch die 24 Stunden vor Ischämie erfolgte Kauterisation beider Aa. vertebrales in Narkose. Der dadurch ggf. abgemilderte ischämische Insult des Gehirns könnte erklären, dass keine oder nur eine abgeschwächte Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen stattgefunden hat. Schließlich sind speziesspezifische Unterschiede dieses Phänomens zwischen kleinen Nagetieren nicht auszuschließen (106).

Mit den Experimenten von Abels vergleichbare Untersuchungen haben Villringer und Mitarbeiter mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie bei Ratten mit 10-minütiger Großhirnischämie durchgeführt (227). Dabei sind rollende und adhärente Leukozyten in Pia-Venolen gefunden worden – und eine einzelne, die Gefäßwand durchwandernde Zelle. Wegen der geringen Anzahl von Versuchen (n=5) und der unterschiedlichen Ergebnisse konnten diese Beobachtungen statistisch jedoch nicht gesichert werden. Dieselbe Arbeitsgruppe hat später berichtet (59), dass eine 10-minütige globale zerebrale Ischämie bei Ratten nur zu einer marginalen Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen führen soll. Jedoch konnte auch diese Folgerung, aufgrund der starken Varianz der Befunde, nicht statistisch bestätigt werden.

Unter Verwendung eines neueren experimentellen Modells mit intraluminale Okklusion der A. cerebri media bei Ratten haben Dirnagl et al. die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen nach transitorischer fokaler Ischämie des Gehirns analysiert (177). Leukozytenrollen und -adhäsion im Gehirn von scheinoperierten Kontrolltieren trat genauso häufig auf wie bei den Tieren der Ischämiegruppe. Diese – gleichwohl marginale – Aktivierung wurde als experimentelles Artefakt durch Implantation des Schädelfensters mit Eröffnung der Dura mater angesehen.

Bereits 1958 hatten Meyer et al. (149) in beeindruckenden Experimenten eine Aktivierung von Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen bei der fokalen zerebralen Ischämie von Affen und Katzen beobachten können – eine Quantifizierung der Phänomene erfolgte jedoch nicht. Hudetz et al. (103) haben sogar eine statistisch signifikante Zunahme von adhärennten Leukozyten *während* einer globalen Ischämie des Gehirns bei Ratten berichtet. Allerdings fiel der Anstieg der Leukozytenadhärenz bei normaler Reperfusion des Gehirns – im Gegensatz zur Reperfusion bei einer Vergleichsgruppe mit experimentell erhöhtem intrakraniellen Druck – bereits 60 min später wieder auf Ausgangsniveau ab.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie eher vom experimentellen Vorgehen abhängt und weniger als ein gesichertes pathophysiologisches Phänomen in Erscheinung tritt. Die eigenen Befunde, v. a. die fehlende Aktivierung unter Kontrollbedingungen und die vergleichsweise lange postischämische Beobachtungsdauer sprechen allerdings zuverlässig dafür, dass die Leukozytenaktivierung tatsächlich als eine Folge der globalen Ischämie des Gehirns, und nicht als experimentelles Artefakt angesehen werden kann.

4.2.6 Leukozyten-Endothelinteraktionen und sekundärer Hirnschaden

Um den Zusammenhang zwischen Leukozytenaktivierung und dem histologischen Hirnschaden zu analysieren, wurden Regressionsanalysen durchgeführt unter der Hypothese, dass diese Blutzellen vermöge ihres Schädigungspotenzials am sekundären Hirnschaden beteiligt sind. Mit den Analysen sollte geprüft werden, ob die Leukozytenaktivierung mit dem Schweregrad des Zellverlusts korreliert. Die Ergebnisse der Regressionsanalysen stützen diese Annahme jedoch *nicht* – bei den Tieren mit größerer Häufigkeit rollender und adhärenter Zellen war der Nervenzellverlust *nicht* stärker ausgeprägt. Im Gegenteil, die Analyse ergab einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit rollender und adhärenter Leukozyten und der Zahl *überlebender* Nervenzellen. Diese zum Teil statistisch signifikante Beziehung wurde für alle Hirn-Strukturen gefunden. Der Zusammenhang zwischen Nervenzell-Überleben und Häufigkeit rollender Leukozyten war stärker ausgeprägt. In manchen Hirn-Strukturen wurde eine statistische Wahrscheinlichkeit von <5% zur Ablehnung der Nullhypothese nur knapp verfehlt bei Regressionskoeffizienten, die für einen direkten Zusammenhang sprechen.

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass es sich um statistische Korrelationen handelt, die keinen kausalen Zusammenhang beweisen. Im übrigen war bei der geringen Zahl von 6 Tieren/Gruppe das Finden einer statistisch gesicherten Korrelation stark vom Einzelwert abhängig und somit nicht sehr robust. Dennoch werden diese Ergebnisse diskutiert und eine Hypothese formuliert.

Die Assoziation – je stärker die Aktivierung von Leukozyten nach Ischämie, desto größer die Anzahl überlebender Neurone – könnte bedeuten, dass aktivierte Leukozyten eine protektive Funktion bei der globalen zerebralen Ischämie haben.

In der Literatur gibt es Berichte, welche diese Hypothese zu unterstützen scheinen. Schott et al. haben (189) das Überleben von Hunden mit 10-minütiger globaler zerebraler Ischämie durch Herzstillstand nach Depletion ihrer neutrophilen Granulozyten untersucht. Sie fanden, dass die neutropenischen Versuchstiere im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe mit normaler Leukozytenzahl signifikant früher verstarben ($15,5 \pm 1,3$ h gegenüber $19,5 \pm 1,3$ h; $p=0,04$). Wegen der geringfügigen Unterschiede zwischen den Überlebenszeiten, der hohen Mortalität der Kontrollgruppe und methodischer Mängel wurde die Studie jedoch angezweifelt (120). Dessen ungeachtet haben Grau et al. auch bei der fokalen zerebralen

Ischämie eine *protektive* Funktion von Leukozyten vermutet. Sie glauben, dass Monozyten und neutrophile Granulozyten beim Patienten in der Frühphase eines ischämischen Schlaganfalls antithrombotische Eigenschaften haben (z. B. durch Hemmung der Plättchen-Aggregation) (88). In weiteren Untersuchungen haben sie berichtet, dass aktivierte Granulozyten beim ischämischen Gewebeuntergang eine überschießende Blutgerinnung eindämmen helfen (88). Von Bedeutung sind auch die Ergebnisse von Schürer et al. (191), dass bei Ratten mit Leukopenie durch Antineutrophilenserum das Hirnödem nach Kälteläsion der Hirnrinde erheblich stärker ausgeprägt ist. Die Autoren vermuten deshalb eine Schutzfunktion von Granulozyten für die Blut-Hirnschranke nach einem Gewebetrauma. U. u. könnten diese Zellen Endothelläsionen unter Mitwirkung von Thrombozyten versiegeln.

Weiterhin könnten aktivierte Leukozyten neurotrophe Faktoren mit protektiven Eigenschaften für Neurone bei der zerebralen Ischämie freisetzen. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) ist ein neurotropher Faktor, der v. a. bei der Entwicklung des Zentralnervensystems eine Rolle spielt, durch Regulation des Überlebens und der Differenzierung von Nervenzellen. Sendtner hat erstmals gezeigt, dass BDNF den Untergang von Motoneuronen nach Axonotomie bei neugeborenen Ratten abschwächt (192). Seitdem ist das neuroprotektive Potenzial von BDNF bei akuten Schädigungen des ZNS mehrfach bestätigt worden. Neurotrophe Faktoren können darüberhinaus das Immunsystem modulieren. MHC-II Rezeptoren, u. a. von Entzündungszellen, werden im Zuge einer Immunantwort durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert. Diese Rezeptoren werden auch im Gehirn bei Entzündungen und akuten Läsionen exprimiert. Neurotrophine wie BDNF, Neurotrophin-3 (NT-3) oder Nerve growth factor (NGF) unterdrücken die Expression von MHC-II Molekülen von aktivierter Mikroglia und damit die Antigen-präsentierenden Fähigkeiten dieser Zellen (162). Ausser Nervenzellen sind auch aktivierte T-, B-Zellen und Monozyten in der Lage BDNF zu produzieren. Hohlfeld und Mitarbeiter haben immunhistochemisch nachgewiesen, dass Leukozyten in entzündlichen Infiltraten bei der akuten Enzephalitis und Multiplen Sklerose BDNF produzieren. Von aktivierten Leukozyten gebildete Neurotrophine unterstützen Wachstum und Überleben von Nervenzellkulturen *in vitro* (114). Es bestehen damit überzeugende Hinweise, dass durch eine Entzündungsreaktion aktivierte Leukozyten die Quelle protektiver und regenerativer Faktoren sind. Eine Akkumulation von aktivierten Leukozyten im ischämischen Parenchym könnte mit einer Freisetzung neurotropher Substanzen einhergehen und dadurch protektiv wirksam sein.

Untersuchungen über die Erholung von paraplegischen Ratten nach Rückenmarksdurchtrennung unterstreichen eindrucksvoll die Funktion der

Entzündungsreaktion und der daran beteiligten Zellen für die Regeneration. Die Implantation von homologen Makrophagen am Ort einer Rückenmarksläsion stimuliert die Regeneration, besonders die Überbrückung von Defekten durch Axonwachstum mit partieller Erholung der motorischen bzw. elektrophysiologischen Funktionen (183).

Dessen ungeachtet gibt es bisher nur wenige experimentelle Befunde über eine protektive Rolle von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie im Vergleich zur Fülle von Beobachtungen, die für eine pathologische Funktion der Leukozytenaktivierung sprechen.

Im übrigen muss der statistische Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Leukozyten-Endothelinteraktionen und der Anzahl überlebender Neurone in vulnerablen Hirnarealen nicht notwendigerweise als Hinweis einer protektiven Funktion der Leukozytenaktivierung verstanden werden. Die zerebrale Ischämie geht mit vielfältigen Veränderungen im Hirngewebe einher, u. a. mit der Induktion von Leukozyten-Endothelinteraktionen und der Bildung und Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Mediatoren. Im ischämischen Gewebe kommt es zur massiven Produktion von Arachidonsäuremetaboliten, freien Radikalen und zahlreichen pathophysiologisch wirksamen Zytokinen und Faktoren, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor Nekrose Faktor (TNF- α), Fibroblast growth factor (FGF), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), Prostaglandin (PG)-D2, PG-F2a, PG-E2, PG-F1a, Thromboxan (TBX), Histamin, Leukotrien-B4, Neuropeptide und viele andere mehr. Die Bildung bzw. Aktivierung dieser Faktoren beginnt bereits in der Initialphase der Reperfusion. Beim Gerbil werden 1 Stunde nach Ischämie erhöhte PAF-Konzentrationen im Kortex und Hippocampus gefunden (163). Arachidonsäuremetabolite erreichen bei dieser Spezies zu Beginn der Reperfusion nach bilateraler Karotisokklusion ein Maximum, waren hingegen 120 min später wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken (78). Auch Saito et al. (187) haben beim Gerbil mit globaler zerebraler Ischämie berichtet, dass Zytokine früh erhöht sind, z. B. TNF- α nach 1 Stunde, IL-1b und IL-6 nach 3 Stunden. Die Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen hat wichtige Konsequenzen für die Aktivierung nachfolgender pathophysiologischer Prozesse, wobei berücksichtigt werden muss, dass die unter diesen Bedingungen gebildeten Mediatoren und Zytokine pro- und antiinflammatorische Wirkungen vermitteln können. Zur Gewährleistung der postischämischen Erholung sind wirksame Defense-Mechanismen vorhanden. Interleukin-1 induziert nicht nur die Aktivierung von Leukozyten, sondern auch eine Fülle anti-entzündlicher Zytokine und trophische Faktoren einschließlich NGF (74). NGF und andere Neurotrophine haben für die Regeneration und das Überleben von Neuronen eine

Schlüsselrolle. Weitere Mediatoren mit ambivalenter Wirkung sind Prostaglandine, die Leukozyten aktivieren und gleichzeitig die Bildung von NGF induzieren (73). Die Applikation von IL-6 beim Gerbil soll bei der globalen zerebralen Ischämie, wie Matsuda et al. (146) gezeigt haben, das neurologische Defizit und den Verlust von Nervenzellen im Hippocampus abschwächen.

Davon ausgehend könnte als Hypothese formuliert werden, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie dort aktiviert werden, wo gleichzeitig protektive Defense-Mechanismen stimuliert werden. Demnach könnte die Leukozytenaktivierung ein *Indikator* für die Regeneration von ischämischem Hirngewebe sein.

Die vorliegenden Ergebnisse machen folgende Interpretationen plausibel:

- i. Die Hypothese, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen am sekundären Hirnschaden bei der globalen zerebralen Ischämie beteiligt sind, kann abgelehnt werden. Es besteht nicht nur kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung und dem ischämischen Verlust von Nervenzellen – das Gegenteil ist der Fall. Je mehr aktivierte Leukozyten (i. e. Rollen/Adhäsion an der Gefäßwand) intravitalmikroskopisch gezählt worden sind, desto geringer war der Nervenzellverlust nach Ischämie. Würde hier ein kausaler Zusammenhang bestehen, müsste allerdings der Verlust von Nervenzellen in vulnerablen Regionen durch Hemmung der Leukozytenaktivierung geringer sein – dieses Postulat müsste durch weitere Versuche geklärt werden.
- ii. Als Antithese wird postuliert, dass die Aktivierung von Leukozyten bei der globalen zerebralen Ischämie eine protektive Funktion hat. Als Beweis dafür müsste deren Hemmung den Gewebeschaden des Gehirns nach Ischämie verstärken.
- iii. Die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie ist ein Sekundärphänomen. Durch den ischämischen Insult (abhängig von Dauer und Schweregrad) werden Mechanismen in Gang gesetzt, die das Überleben von Nervenzellen fördern. Der Insult geht – davon unabhängig – auch mit der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen einher – als Indikator einer

einsetzenden Regeneration. Aus dieser Sicht jedoch sollte eine selektive Hemmung von Leukozyten-Endothelinteraktionen keinen Einfluss auf die Entwicklung oder das Ausmaß des ischämischen Hirnschadens haben.

Tatsächlich sprechen viele experimentelle und klinische Befunde dafür, dass die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen nicht notwendigerweise mit der Verstärkung des ischämischen Gewebeschadens verbunden sein muss. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen machen indessen deutlich, dass Pauschalaussagen – „die Leukozytenaktivierung bei der zerebralen Ischämie ist toxisch (oder protektiv)“ – nicht zulässig sind. Vielmehr muss im Detail differenziert werden, wo und wann Leukozyten aktiviert werden und akkumulieren, um beurteilen zu können, ob dieser Vorgang an der Entstehung des ischämischen Hirnschadens mitwirkt oder diesen abschwächt.

Die Folgen eines globalen ischämischen Insults für das Schicksal betroffener Nervenzellen oder des Parenchyms hängen offenbar vom Gleichgewicht zwischen schädigenden und Rescue-Mechanismen ab – stehen also unter dem Einfluss des Ischämie-Schweregrads und gegebenenfalls therapeutischer Interventionen.

Größen mit Einfluss sind:

- i. Art der Ischämie: global, fokal, transitorisch oder permanent
- ii. Schweregrad und Ausdehnung des ischämischen Insults. Die Dauer der Ischämie, die Größe der ischämischen Hirnprovinz, ebenso die Qualität der Reperfusion kann die Aktivierung von Leukozyten determinieren.
- iii. Zeitpunkt der Leukozytenaktivierung: Aktivierte Leukozyten haben in der frühen Reperusionsphase, u. a. durch gesteigerte Produktion von Radikalen oder Verlegung von Kapillaren, offenbar toxische Eigenschaften, wohingegen die später erforderliche Abräumreaktion dieser Zellen mit Produktion von trophischen Faktoren protektiv ist.
- iv. Ort der Aktivierung: Innerhalb enger Grenzen sind gegensätzliche Wirkungen denkbar, z. B. im Bereich einer Pannekrose im Vergleich zur angrenzenden vitalen Penumbra. Von Bedeutung ist auch, ob die Leukozytenaktivierung intravasal oder erst nach Emigration ins Parenchym erfolgt.
- v. Extrakranielle Faktoren: Begleiterkrankungen, z. B. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder der Status der extrakraniellen Gefäße (Arteriosklerose), können Auswirkungen auf das Ausmaß der Leukozytenaktivierung haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes experimentelles Modell für die Induktion einer globalen zerebralen Ischämie eingesetzt. Der Schweregrad der Ischämie und die Qualität der Reperfusion wurden kontinuierlich durch Laser-Doppler-Fluxmetrie überwacht. Der Einsatz der Intravitalmikroskopie erlaubte die Beurteilung von Vorkommen und Dynamik von Leukozyten-Endothelinteraktionen vor Ischämie und in der Reperfusionsphase. Die Quantifizierung des Nervenzellverlusts bei denselben Tieren war Grundlage für eine Korrelationsanalyse zwischen der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und dem Überleben von Nervenzellen nach Ischämie. Der ischämische Insult führte zu einer Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und einem Nervenzellverlust in vulnerablen Arealen des Gehirns. Statistische Korrelationsanalysen haben dabei einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung und der Häufigkeit von überlebenden Nervenzellen ergeben. Mit selektiver Blockade der Leukozytenadhäsion, z. B. durch Antikörper gegen Selektine oder Integrine, könnte aufgeklärt werden, ob Leukozyten-Endothelinteraktionen an der Entstehung des ischämischen Hirnschadens kausal beteiligt sind oder nicht (14).

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine umfassende Hemmung der Entzündungsreaktion als therapeutische Maßnahme gegen den ischämischen Nervenzellverlust des Gehirns nach globaler zerebraler Ischämie nicht erfolgversprechend sein kann. Eine wirksame (kausale) Behandlung macht somit weiterhin eine detaillierte Aufklärung der dem ischämischen Nervenzelluntergang bzw. Gewebeschaden zugrundeliegenden Mechanismen erforderlich, als Grundlage einer besser wirksamen Antagonisierung. Von Bedeutung ist ebenfalls die frühzeitige Unterstützung von Erholungsmechanismen in der postischämischen Regeneration der geschädigten Nervenzellen bis hin zu den Maßnahmen der funktionellen Rehabilitation.

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat die Bedeutung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie zum Thema. Weiße Blutkörperchen besitzen ein enormes pathophysiologisches Potenzial, das bei Überaktivierung oder Fehlregulation für viele Symptome von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und für den Untergang von Gewebe verantwortlich ist. Leukozyten sind Mediatorzellen des sekundären Gewebes Schadens bei der Ischämie und nachfolgenden Reperfusion, wie für viele Organe gezeigt wurde. Auch bei der globalen zerebralen Ischämie wird eine pathogenetische Rolle von Leukozyten – bislang kontrovers – diskutiert. Zahlreiche Befunde sind aus klinischen und experimentellen Studien hervorgegangen, die sowohl für als auch gegen eine Beteiligung von aktivierten Leukozyten am ischämischen Hirnschaden sprechen. Die Bedeutung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und von Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation sind in diesem Zusammenhang nach wie vor nicht geklärt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, das Verhalten von Leukozyten und die zerebrale Mikrozirkulation bei der globalen zerebralen Ischämie zu untersuchen, einschließlich der morphologischen und funktionellen Auswirkungen von pathologischen Veränderungen.

Für diese Untersuchungen wurde erstmals ein *chronisches* Modell der globalen zerebralen Ischämie mit Mongolischen Wüstenrennmäusen etabliert, das die Quantifizierung von Parametern der Mikrozirkulation, insbesondere von Leukozyten-Endothelinteraktionen, ermöglichte, sowie von funktionellen Defiziten und von Nervenzelluntergängen. Die Präparation eines geschlossenen Schädelfensters mit Erhalt einer intakten Dura mater und die einfache, wenig traumatische, extrakranielle, reversible Unterbindung beider Halsschlagadern zur Induktion der Ischämie erlaubte das Überleben der Versuchstiere. Somit konnte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der zerebralen Mikrozirkulation mit der Erhebung morphologischer Parameter anhand histologischer Untersuchungen und von funktionellen Defiziten bei denselben Versuchstieren unter chronischen Bedingungen kombiniert werden.

Die beidseitige, 15-minütige Karotisokklusion führte zur ausgeprägten Ischämie des Großhirns gefolgt von einer, auch in anderen Untersuchungen beschriebenen, typischen postischämischen Hyper- und verzögerten Hypoperfusion des Gehirns. Diese Änderungen der

Hirndurchblutung konnten in enger Korrelation mit Laser-Doppler Fluxmetrie und Bestimmung der arteriovenösen Transitzeit bestätigt werden. Die einfache Berechnung der arteriovenösen Transitzeit wurde als Verfahren validiert die regionale Durchblutung wiederholt und ohne Traumatisierung durch Intravitalmikroskopie zu bestimmen.

Die globale zerebrale Ischämie führt zu einer eher kurzen Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen mit stetem Anstieg der Zahl rollender und adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen in der frühen Reperfusionphase bis 3 Stunden nach dem Insult. Sechs Stunden nach Reperfusionbeginn nahm die Leukozytenaktivierung wieder ab, nach 7 Stunden war sie auf das Niveau von Kontrolltieren abgefallen. Die Aktivierung war unabhängig vom Status der mikrovaskulären Perfusion; sie konnte in den histologischen Schnitten mit Leukozyten-spezifischer Färbung auch in den tiefen, parenchymatösen Strukturen nachgewiesen werden. Unter Kontrollbedingungen fanden in den Hirngefäßen keine Interaktionen von Leukozyten mit dem Endothel statt, eine weitere Beobachtung, die wie der Erhalt der Blut-Hirnschrankenintegrität für die Qualität des Modells spricht.

Ein andauernder Verschluss von Kapillaren durch Leukozyten – *Plugging* – konnte nicht beobachtet werden. Ebenso wenig wurde eine Veränderung der Zahl perfundierter Kapillaren in der postischämischen Phase gefunden, die Kapillardichte blieb nach dem ischämischen Insult unverändert.

Eine globale Ischämie des Gehirns führt zu neurologischen Defiziten, Änderungen des Verhaltens und zu einer Abnahme des Körpergewichts. Vier Tage nach Insult wurde ein erheblicher Untergang von selektiv vulnerablen Nervenzellen im Kortex, Hippocampus und Striatum festgestellt, wobei das Ausmaß des Zellverlusts im Kortex mit dem Auftreten der funktionellen Ausfälle korreliert war.

Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung und des neurologischen Defizits oder dem Verlust an Körpergewicht konnte nicht festgestellt werden. Ebenso wenig konnte bestätigt werden, dass vermehrtes Vorkommen von Rollern und Stickern den ischämischen Gewebeschaden vergrößert. Im Gegenteil – wider alle Erwartungen – war das Ausmaß der Leukozytenaktivierung direkt proportional zur Anzahl überlebender Neurone in vulnerablen Hirnarealen. Dieser Zusammenhang war als Trend in fast allen Hirnarealen erkennbar und erreichte in einigen sogar signifikantes Niveau.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die globale zerebrale Ischämie Leukozyten-Endothelinteraktionen aktiviert – allerdings nur vorübergehend. Eine Beteiligung der Leukozytenaktivierung an der postischämischen Minderperfusion des Gehirns war nicht nachweisbar.

Die Ausgangshypothese, dass aktivierte Leukozyten den ischämischen Hirnschaden verstärken, konnte nicht bestätigt werden. Das Vorliegen eines statistischen Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung und der Zahl von *überlebenden* Nervenzellen könnte neue Hypothesen generieren; z. B. könnten aktivierte Leukozyten neuroprotektive Eigenschaften haben und/oder regenerative Prozesse im postischämischen Gehirn unterstützen.

Zusammengefasst kommt es in diesem experimentellen Modell einer globalen zerebralen Ischämie beim Gerbil zu einer transitorischen Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen, jedoch ohne dass dadurch der sekundäre Hirnschaden verstärkt würde. Diese Beobachtung ist neu – sie kann hierzu vorliegende widersprüchliche Befunde über die Bedeutung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen Ischämie besser verständlich machen.

Die hier formulierten Hypothesen eignen sich für eine experimentelle Überprüfung u. a. durch intravitalmikroskopische Untersuchungen bei der globalen zerebralen Ischämie unter gezielter Hemmung von Leukozyten-Endothelinteraktionen, z. B. durch monoklonale Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle.

Schriftumsverzeichnis

- (1) Abels C. Auswirkungen einer globalen zerebralen Ischämie auf das Verhalten von Leukozyten in der Mikrozirkulation des Gehirns. Ludwig-Maximilians-Universität München, 1996.
- (2) Abels C, Rohrich F, Corvin S, Meyermann R, Baethmann A, Schurer L. Leukocyte-endothelium-interaction in pial vessels following global, cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien)* 2000; 142(3):333-339.
- (3) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381):1322-1326.
- (4) Allen KL, Almeida A, Bates TE, Clark JB. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia. *J Neurochem* 1995; 64(5):2222-2229.
- (5) Ames A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968; 52(2):437-453.
- (6) Arbelaez A, Castillo M, Mukherji SK. Diffusion-weighted MR imaging of global cerebral anoxia. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20(6):999-1007.
- (7) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-1308.
- (8) Aspey BS, Jessimer C, Pereira S, Harrison MJ. Do leukocytes have a role in the cerebral no-reflow phenomenon? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52(4):526-528.
- (9) Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12:723-725.
- (10) Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977; 8(1):51-57.
- (11) Aukland K, Bower BF, Berliner RW. Measurement of Local Blood Flow with Hydrogen Gas. *Circ Res* 1964; 14:164-187.
- (12) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(2):85-91.
- (13) Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD. Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(2):202-213.
- (14) Baethmann A. Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg Rev* 1978; 1:171-195.
- (15) Baethmann A. Mechanisms of secondary brain damage. In: Cohadon F, Baethmann A, Go KG, Miller JD, editors. *Traumatic Brain Edema*. Padua: Liviana Press, 1987: 81-97.
- (16) Baethmann A. Brain Edema and Leukocyte-Endothelial Interactions in Cerebral Ischemia. *Advances in Legal Medicine*. In press.
- (17) Baethmann A, Kempfski O. Biochemical Factors and Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma. In: Bazan N, Braquet P, Ginsberg MD, editors. *Neurochemical Correlates of Cerebral Ischemia*. New York: Plenum Press, 1992: 295-320.

- (18) Baethmann A, Maier-Hauff K, Staub F, Schneider GH, Rothenfusser W, Kempski O. Glutamate as a mediator of secondary brain damage. In: Kempski O, editor. *Glutamate - transmitter and toxin*. München, Bern, Wien: Zuckerschwerdt, 1993: 65-75.
- (19) Baethmann A, Staub F. Cellular Edema. In: Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Academic Press, 1997: 153-156.
- (20) Baird AE, Benfield A, Schlaug G, Siewert B, Lovblad KO, Edelman RR et al. Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1997; 41(5):581-589.
- (21) Bednar MM, Raymond S, McAuliffe T, Lodge PA, Gross CE. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke* 1991; 22(1):44-50.
- (22) Bellamy R, Safar P, Tisherman SA, Basford R, Bruttig SP, Capone A et al. Suspended animation for delayed resuscitation. *Crit Care Med* 1996; 24(2 Suppl):S24-S47.
- (23) Berlitz P, Popescu O, Klotzsch C, Diehl RR, Berg-Dammer E. [Treatment of acute stroke on the stroke unit. Initial experiences with an acute stroke unit in Germany]. *Nervenarzt* 1997; 68(2):122-128.
- (24) Block F, Pergande G, Schwarz M. Flupirtine reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res* 1997; 754(1-2):279-284.
- (25) Block F, Schwarz M. Global ischemic neuronal damage relates to behavioural deficits: a pharmacological approach. *Neuroscience* 1998; 82(3):791-803.
- (26) Block F, Schwarz M. Neuroprotektion beim Schlaganfall. *Nervenarzt* 1999; 70:101-110.
- (27) Bodsch W, Barbier A, Oehmichen M, Grosse OB, Hossmann KA. Recovery of monkey brain after prolonged ischemia. II. Protein synthesis and morphological alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6(1):22-33.
- (28) Borgos J. Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow. *Neurol Res* 1996; 18(3):251-255.
- (29) Bowes MP, Zivin JA, Rothlein R. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Exp Neurol* 1993; 119(2):215-219.
- (30) Brown AW, Brierley JB. The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *Br J Exp Pathol* 1968; 49(2):87-106.
- (31) Brown JM, Grosso MA, Moore EE. Hypertonic saline and dextran: impact on cardiac function in the isolated rat heart. *J Trauma* 1990; 30(6):646-650.
- (32) Bubis JJ, Fujimoto T, Ito U, Mrsulja BJ, Spatz M, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. v. Ultrastructural changes in H3 sector of the hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 1976; 36(3):285-294.
- (33) Bures J, Buresova O, Huston J. *Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior*. Elsevier, 1976.
- (34) Burstone MS. The cytochemical localization of esterase. *J Natl Cancer Inst* 1957; 18:167.
- (35) Capdeville C, Pruneau D, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Naloxone effect on the neurological deficit induced by forebrain ischemia in rats. *Life Sci* 1986; 38(5):437-442.
- (36) Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27(6):1124-1129.
- (37) Chapman G, Cokelet G. Model studies of leukocyte-endothelium-blood interactions. I. The fluid flow drag force on the adherent leukocyte. *Biorheology* 1996; 33(2):119-138.

- (38) Chen LY, Nichols WW, Hendricks JB, Yang BC, Mehta JL. Monoclonal antibody to P-selectin (PB1.3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc Res* 1994; 28(9):1414-1422.
- (39) Chen ZL, Indyk JA, Bugge TH, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S. Neuronal death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *J Neurosci* 1999; 19(22):9813-9820.
- (40) Chiang J, Kowada M, Ames A, Wright RL, Majno G. Cerebral ischemia. . Vascular changes. *Am J Pathol* 1968; 52(2):455-476.
- (41) Choudhri TF, Hoh BL, Prestigiacomo CJ, Huang J, Kim LJ, Schmidt AM et al. Targeted inhibition of intrinsic coagulation limits cerebral injury in stroke without increasing intracerebral hemorrhage. *J Exp Med* 1999; 190(1):91-99.
- (42) Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ESJ et al. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 1998; 102(7):1301-1310.
- (43) Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J Neurosurg* 1991; 75(4):623-627.
- (44) Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 1991; 22(7):877-883.
- (45) Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 1999; 19(11):4200-4210.
- (46) Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD et al. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 1996; 97(1):209-216.
- (47) Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1988; 27(2):387-402.
- (48) Creutzfeldt OD. Einleitung: Ethik, Wissenschaft und Tierversuche. In: Ullrich KJ, Creutzfeldt OD, editors. *Gesundheit und Tierschutz*. Düsseldorf und Wien: Econ, 1985: 11-43.
- (49) de la Torre JC, Fortin T, Saunders JK, Butler K, Richard MT. The no-reflow phenomenon is a post-mortem artifact. *Acta Neurochir (Wien)* 1992; 115(1-2):37-42.
- (50) Dearden NM. Ischaemic brain. *Lancet* 1985; 2(8449):255-259.
- (51) del Zoppo GJ. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6(1):47-96.
- (52) del Zoppo GJ. Clinical trials in acute stroke: why have they not been successful? *Neurology* 1998; 51(3 Suppl 3):S59-S61.
- (53) del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22(10):1276-1283.
- (54) del ZG, Schmid SG, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22(10):1276-1283.
- (55) DeRyck M, Keermaeckers R, Duytschaever H, Claes C, Clincke G, Janssen M et al. Lubeluzole protects sensorimotor function and reduces infarct size in a photochemical stroke model in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279:748-758.

- (56) Diaz FG, Ausman JI. Experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1980; 6(4):436-445.
- (57) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22(9):391-397.
- (58) Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9(5):589-596.
- (59) Dirnagl U, Niwa K, Sixt G, Villringer A. Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 1994; 25(5):1028-1038.
- (60) Dirnagl U, Pulsinelli W. Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10(3):327-336.
- (61) Dougherty JHJ, Levy DE, Weksler BB. Experimental cerebral ischemia produces platelet aggregates. *Neurology* 1979; 29(11):1460-1465.
- (62) Drayer BP, Wolfson SK, Reinmuth OM, Dujovny M, Boehnke M, Cook EE. Xenon enhanced CT for analysis of cerebral integrity, perfusion, and blood flow. *Stroke* 1978; 9(2):123-130.
- (63) Du BM, Bowman PD, Goldstein GW. Cell proliferation after ischemic infarction in gerbil brain. *Brain Res* 1985; 347(2):245-252.
- (64) Eguchi Y, Yamashita K, Iwamoto T, Ito H. Effects of brain temperature on calmodulin and microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Neurotrauma* 1997; 14(2):109-118.
- (65) Eke A, Conger KA. Classifying cells from light microscopic bit features by binary logic. Application to grade neuronal injury in cerebral ischemia. *Lab Invest* 1989; 61(2):243-252.
- (66) Eke A, Conger KA, Anderson M, Garcia JH. Histologic assessment of neurons in rat models of cerebral ischemia. *Stroke* 1990; 21(2):299-304.
- (67) Eriskat J. Wachstumskinetik der Parenchymnekrose des Gehirns nach fokalem Trauma. Ludwig-Maximilians-Universität, 2000.
- (68) Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281(5381):1317-1322.
- (69) Fieschi C, Bozzao L, Agnoli A, Kety S. Misurazioni regionali del flusso sanguigno cerebrale mediante registrazioni in profondita delle curve di "clearance" di idrogeno. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1964; 40:1505-1509.
- (70) Firrell JC, Lipowsky HH. Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat. *Am J Physiol* 1989; 256(6 Pt 2):H1667-H1674.
- (71) Fischer EG, Ames A, Hedley-Whyte ET, O'Gorman S. Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon". *Stroke* 1977; 8(1):36-39.
- (72) Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol Chem Neuropathol* 1990; 12(1):55-70.
- (73) Friedman WJ, Larkfors L, Ayer-LeLievre C, Ebendal T, Olson L, Persson H. Regulation of beta-nerve growth factor expression by inflammatory mediators in hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 1990; 27(3):374-382.
- (74) Friedman WJ, Thakur S, Seidman L, Rabson AB. Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB. *J Biol Chem* 1996; 271(49):31115-31120.

- (75) Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994; 145(3):728-740.
- (76) Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del ZG. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994; 144(1):188-199.
- (77) Garcia JH, Lossinsky AS, Kauffman FC, Conger KA. Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry. *Acta Neuropathol Berl* 1978; 43(1-2):85-95.
- (78) Gaudet RJ, Alam I, Levine L. Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J Neurochem* 1980; 35(3):653-658.
- (79) Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343(6260):757-760.
- (80) Gerlach D. *Das Lichtmikroskop*. 2 ed. Thieme, 1985.
- (81) Gerthsen C, Kneser HO, Vogel H. *Physik*. 15 ed. Springer-Verlag, 1986.
- (82) Gibbs FA. A thermoelectric blood flow recorder in the form of a needle. *Poc Soc Exp Biol Med* 1933; 31:141-146.
- (83) Ginsberg MD. Animal Models of Global and Focal Cerebral Ischemia. In: Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Academic Press, 1997: 124-126.
- (84) Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 1989; 20(12):1627-1642.
- (85) Glickman SE, Higgins TJ, Isaacson RL. Some effects of hippocampal lesions on the behavior of Mongolian gerbils. *Physiol Behav* 1970; 5(8):931-938.
- (86) Graham DI, Adams JH. Ischaemic brain damage in fatal head injuries. *Lancet* 1971; 1(7693):265-266.
- (87) Graham DI, Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE et al. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52(3):346-350.
- (88) Grau AJ, Graf T, Hacke W. Altered influence of polymorphonuclear leukocytes on coagulation in acute ischemic stroke. *Thromb Res* 1994; 76(6):541-549.
- (89) Groggaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors KE. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9(4):500-505.
- (90) Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. *Am J Physiol* 1989; 256(4 Pt 2):H1247-H1254.
- (91) Häder DP, Häder M. *Moderne Labortechniken*. 1 ed. Thieme, 1993.
- (92) Hakamata Y, Ito U, Hanyu S, Yoshida M. Changes in cranial and rectal temperature, blood pressure and arterial blood gas during and after unilateral and bilateral forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Neurosci Res* 1993; 18(1):73-78.
- (93) Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB et al. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 1986; 17(2):246-253.
- (94) Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G et al. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins [see comments]. *J Immunol Methods* 1992; 146(2):219-228.

- (95) Hartl R, Medary MB, Ruge M, Arfors KE, Ghajar J. Early white blood cell dynamics after traumatic brain injury: effects on the cerebral microcirculation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(11):1210-1220.
- (96) Hartl R, Schurer L, Schmid-Schonbein GW, del Zoppo GJ. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(6):1108-1119.
- (97) Heiss WD, Graf R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 1994; 7(1):11-19.
- (98) Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 1977; 20(1):55-79.
- (99) Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996; 8(3):195-208.
- (100) Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia [see comments]. *Ann Neurol* 1994; 36(4):557-565.
- (101) Hossmann KA, Grosse OB. Recovery of monkey brain after prolonged ischemia. I. Electrophysiology and brain electrolytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6(1):15-21.
- (102) Hossmann KA, Schmidt-Kastner R, Grosse OB. Recovery of integrative central nervous function after one hour global cerebro-circulatory arrest in normothermic cat. *J Neurol Sci* 1987; 77(2-3):305-320.
- (103) Hudetz AG, Wood JD, Kampine JP. Nitric oxide synthase inhibitor augments post-ischemic leukocyte adhesion in the cerebral microcirculation in vivo. *Neurol Res* 1999; 21(4):378-384.
- (104) Ito U, Spatz M, Walker-JT J, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol Berl* 1975; 32(3):209-223.
- (105) Jay TM, Lucignani G, Crane AM, Jehle J, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with [¹⁴C]iodoantipyrine in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8(1):121-129.
- (106) Jesch NK, Dorger M, Messmer K, Krombach F. Formation of nitric oxide by rat and hamster alveolar macrophages: an interstrain and interspecies comparison. *Toxicol Lett* 1998; 96-97:47-51:47-51.
- (107) Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 1993; 120(1):70-88.
- (108) Karasawa Y, Araki H, Otomo S. Changes in locomotor activity and passive avoidance task performance induced by cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Stroke* 1994; 25(3):645-650.
- (109) Kato H, Araki T, Kogure K. Preserved neurotransmitter receptor binding following ischemia in preconditioned gerbil brain. *Brain Res Bull* 1992; 29(3-4):395-400.
- (110) Kato H, Araki T, Kogure K, Murakami M, Uemura K. Sequential cerebral blood flow changes in short-term cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 1990; 21(9):1346-1349.
- (111) Katsuta K, Nakanishi H, Shirakawa K, Yoshida K, Takagi K, Tamura A. The neuroprotective effect of the novel noncompetitive NMDA antagonist, FR115427 in focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15(2):345-348.
- (112) Kawamura S, Schurer L, Goetz A, Kempfski O, Schmucker B, Baethmann A. An improved closed cranial window technique for investigation of blood- brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 1990; 9(4):369-383.
- (113) Kempfski OS. [Neuroprotection. Models and basic principles]. *Anaesthesist* 1994; 43 Suppl 2:S25-33:S25-S33.

- (114) Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999; 189(5):865-870.
- (115) Kety S, Schmidt CF. The determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentrations. *Am J Physiol* 1945; 143:53-66.
- (116) Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239(1):57-69.
- (117) Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984; 62(3):209-218.
- (118) Kirkeby OJ, Rise IR, Nordsletten L, Skjeldal S, Hall C, Risoe C. Cerebral blood flow measured with intracerebral laser-Dopplerflow probes and radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 1995; 79(5):1479-1486.
- (119) Kirkpatrick UJ, Adams RA, Lardi A, McCollum CN. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br J Haematol* 1998; 101(2):364-368.
- (120) Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23(9):1367-1379.
- (121) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76(1):65-71.
- (122) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59(6):612-619.
- (123) Kuroda S, Katsura K, Hillered L, Bates TE, Siesjo BK. Delayed treatment with alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) attenuates secondary mitochondrial dysfunction after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Neurobiol Dis* 1996; 3(2):149-157.
- (124) Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. Postischemic halothane anesthesia and motor hyperactivity in gerbil. *Neuropatol Pol* 1990; 28(3-4):185-187.
- (125) Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. Locomotor hyperactivity and hippocampal CA1 injury after transient forebrain ischemia of gerbils. *Neurosci Lett* 1991; 122(2):141-144.
- (126) Kusumoto M, Arai H, Mori K, Sato K. Resistance to cerebral ischemia in developing gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15(5):886-891.
- (127) Larson KB, Markham J, Raichle ME. Tracer-kinetic models for measuring cerebral blood flow using externally detected radiotracers. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7(4):443-463.
- (128) Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J et al. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1729-1738.
- (129) Lee JG, Hudetz AG, Smith JJ, Hillard CJ, Bosnjak ZJ, Kampine JP. The effects of halothane and isoflurane on cerebrocortical microcirculation and autoregulation as assessed by laser-Doppler flowmetry. *Anesth Analg* 1994; 79(1):58-65.
- (130) Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 1966; 16(3):255-262.
- (131) Levine S, Sohn D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 1969; 87(3):315-317.
- (132) Levy DE, Brierley JB. Communications between vertebro-basilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp Neurol* 1974; 45(3):503-508.

- (133) Ley K, Gaehtgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 1991; 69(4):1034-1041.
- (134) Ley K, Lundgren E, Berger E, Arfors KE. Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate. *Blood* 1989; 73(5):1324-1330.
- (135) Li H, Colbourne F, Sun P, Zhao Z, Buchan AM, Iadecola C. Caspase Inhibitors Reduce Neuronal Injury After Focal but Not Global Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* 2000 Jan ;31 (1):176 -182
31(1):176-182.
- (136) Li PA, Gisselsson L, Keuker J, Vogel J, Smith ML, Kuschinsky W et al. Hyperglycemia-exaggerated ischemic brain damage following 30 min of middle cerebral artery occlusion is not due to capillary obstruction. *Brain Res* 1998; 804(1):36-44.
- (137) Li PA, Kristian T, Shamloo M, Siesjo K. Effects of preischemic hyperglycemia on brain damage incurred by rats subjected to 2.5 or 5 minutes of forebrain ischemia. *Stroke* 1996; 27(9):1592-1601.
- (138) Li PA, Siesjo BK. Role of hyperglycaemia-related acidosis in ischaemic brain damage. *Acta Physiol Scand* 1997; 161(4):567-580.
- (139) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79(4):1431-1568.
- (140) Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4(11):1241-1243.
- (141) Lorente dN. Studies on the Structure of the Cerebral Cortex II. Continuation of the Study of the Ammonic System. *J Psychol Neurol* 1934; 46:113-177.
- (142) Lorenzl S, Koedel U, Dirnagl U, Ruckdeschel G, Pfister HW. Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1993; 168(4):927-933.
- (143) Loskota WJ, Lomax P, Verity MA. A stereotactic atlas of the mongolian gerbil brain (*Meriones unguiculatus*). *Ann Arbor Sci, Ann Arbor*, 1974.
- (144) Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2):507-515.
- (145) Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30(8):4217-4223.
- (146) Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H et al. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci Lett* 1996; 204(1-2):109-112.
- (147) McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989; 84(1):92-99.
- (148) McGraw CP. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. *Arch Neurol* 1977; 34(6):334-336.
- (149) Meyer JS. Localized changes in properties of the blood and effects of anticoagulant drugs in experimental cerebral infarction. *N Engl J Med* 1958; 258:151-159.
- (150) Mies G, Paschen W, Hossmann KA. Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10(5):638-645.
- (151) Miller FN, Sims DE, Schuschke DA, Abney DL. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 1992; 44(2):166-184.

- (152) Miller FN, Sims DE, Schuschke DA, Abney DL. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 1992; 44(2):166-184.
- (153) Minato H, Kikuta C, Fujitani B, Masuda Y. Protective effect of zonisamide, an antiepileptic drug, against transient focal cerebral ischemia with middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *Epilepsia* 1997; 38(9):975-980.
- (154) Molinari GF, Laurent JP. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 1976; 7:14-17.
- (155) Moloney WC, McPherson K, Fliegerman L. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem* 1960; 8:200.
- (156) Mori E, del ZG, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 1992; 23(5):712-718.
- (157) Morii S, Ngai AC, Winn HR. Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide: with detailed description of the closed cranial window technique in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6(1):34-41.
- (158) Mumenthaler M, Mattle H. *Neurologie*. 10 ed. Thieme, 1997.
- (159) Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9063):1436-1442.
- (160) Nash GB, Jones JG, Mikita J, Christopher B, Dormandy JA. Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 1988; 70(2):171-176.
- (161) Nemoto EM, Hossmann KA, Cooper HK. Post-ischemic hypermetabolism in cat brain. *Stroke* 1981; 12(5):666-676.
- (162) Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(10):5779-5784.
- (163) Nishida K, Markey SP. Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in gerbils. *Stroke* 1996; 27(3):514-518.
- (164) Nissl F. Nervensystem. In: Ehrlich P, editor. *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik*. Berlin: Urban und Schwarzenberg, 1919.
- (165) Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(5):244-249.
- (166) Obrenovitch TP. The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7(4):297-323.
- (167) Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25(9):1847-1853.
- (168) Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del ZG. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25(1):202-211.
- (169) Olesen SP. Leakiness of rat brain microvessels to fluorescent probes following craniotomy. *Acta Physiol Scand* 1987; 130(1):63-68.
- (170) Osgood CP, Dujovny M, Wisotzkey H. Acute canine cerebral ischemia: a preliminary model to evaluate microvascular mammary-carotid anastomosis. *Stroke* 1974; 5(4):477-482.

- (171) Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Hoyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12(3):484-490.
- (172) Pahlmark K, Siesjo BK. Effects of the spin trap-alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) in transient forebrain ischaemia in the rat. *Acta Physiol Scand* 1996; 157(1):41-51.
- (173) Pardridge WM. Blood-Brain Barrier Transport Mechanisms. In: Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 21-25.
- (174) Park TS, Gonzales ER, Gidday JM. Platelet-activating factor mediates ischemia-induced leukocyte-endothelial adherence in newborn pig brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(4):417-424.
- (175) Paschen W, Doutheil J. Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? [see comments]. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(1):1-18.
- (176) Pawlik G, Rackl A, Bing RJ. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res* 1981; 208(1):35-58.
- (177) Peters O, Back T, Lindauer U, Dirnagl U. Leukocytes do not participate in the burst-like production of oxygen-free radicals during early reperfusion in a model of reversible middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 19 (Suppl), S571. 1999.
Ref Type: Abstract
- (178) Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Jr., Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 1999; 30(5):1110-1117.
- (179) Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10(3):267-272.
- (180) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11(5):491-498.
- (181) Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE. Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1982; 11(5):499-502.
- (182) Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 2):H1801-H1806.
- (183) Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 1998; 4(7):814-821.
- (184) Ravina AF. De motu cerebri. *Memorie Acad Sci Torino* 1918:61-93.
- (185) Reed MW, Miller FN. Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 1988; 36(1):104-107.
- (186) Rovainen CM, Woolsey TA, Blocher NC, Wang DB, Robinson OF. Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13(3):359-371.
- (187) Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS. Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett* 1996; 206(2-3):149-152.
- (188) Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin GL, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol* 1978; 234(1):H59-H66.

- (189) Schott RJ, Natale JE, Ressler SW, Burney RE, D'Alecy LG. Neutrophil depletion fails to improve neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. *Ann Emerg Med* 1989; 18(5):517-522.
- (190) Schurer L, Groggaard B, Gerdin B, Kempfski O, Arfors KE. Leucocyte depletion does not affect post-ischaemic nerve cell damage in the rat. *Acta Neurochir (Wien)* 1991; 111(1-2):54-60.
- (191) Schurer L, Prugner U, Kempfski O, Arfors KE, Baethmann A. Effects of antineutrophil serum (ANS) on posttraumatic brain oedema in rats. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990; 51:49-51:49-51.
- (192) Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992; 360(6406):757-759.
- (193) Shaw C, Alvord EC, Berry RG. Swelling of the brain following ischemic infarction with arterial occlusion. *Arch Neurol* 1959; 1:161-177.
- (194) Siesjo BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1(2):155-185.
- (195) Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77(2):169-184.
- (196) Siesjo BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjo P et al. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 1995; 12(5):943-956.
- (197) Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T, Li PA, Siesjo P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1996; 66:8-14:8-14.
- (198) Siesjo BK, Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13(3):247-268.
- (199) Smith SE, Meldrum BS. Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal ischemia in rats. *Stroke* 1995; 26(1):117-121.
- (200) Soriano SG, Coxon A, Wang YF, Frosch MP, Lipton SA, Hickey PR et al. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* 1999; 30(1):134-139.
- (201) Soriano SG, Wang YF, Wagner DD, Frenette PS. P- and E-selectin-deficient mice are susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Brain Res* 1999; 835(2):360-364.
- (202) Spinnewyn B, Blavet N, Clostre F, Bazan N, Braquet P. Involvement of platelet-activating factor (PAF) in cerebral post-ischemic phase in Mongolian gerbils. *Prostaglandins* 1987; 34(3):337-349.
- (203) Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76(2):301-314.
- (204) Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H, Kempfski O. Effects of lactacidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10(6):866-876.
- (205) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Intravital microscopy after ischemia reperfusion in the striated muscle: Adverse effects of fluorescent dyes? *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 16, 50. 1996. Ref Type: Abstract
- (206) Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, Abels C, Messmer K. Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 1998; 9(5):345-351.
- (207) Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 1997; 272(4 Pt 2):H1710-H1716.

- (208) Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Esslinger HU et al. Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int* 1981; 20(2):230-239.
- (209) Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975; 254(5495):56-58.
- (210) Stevens MK, Yaksh TL, Hansen RB, Anderson RE. Effect of preischemia cyclooxygenase inhibition by zomepirac sodium on reflow, cerebral autoregulation, and EEG recovery in the cat after global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6(6):691-702.
- (211) Stossek K, Lubbers DW, Cottin N. Determination of local blood flow (microflow) by electrochemically generated hydrogen. Construction and application of the measuring probe. *Pflugers Arch* 1974; 348(3):225-238.
- (212) Stummer W. Protektion des Gehirns durch spontane Lokomotion bei der zerebralen Ischämie. Experimentelle Untersuchungen mit Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones Unguiculatus*). 1997.
- (213) Stummer W, Baethmann A, Murr R, Schurer L, Kempfski OS. Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils. Underlying mechanisms. *Stroke* 1995; 26(8):1423-1429.
- (214) Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia [see comments]. *Stroke* 1994; 25(9):1862-1869.
- (215) Takeshima R, Kirsch JR, Koehler RC, Gomoll AW, Traystman RJ. Monoclonal leukocyte antibody does not decrease the injury of transient focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 1992; 23(2):247-252.
- (216) Tamura A, Nakayama H. Neuronal Damage in Remote Areas after Focal Cerebral Infarkt: Retrograde Degeneration and Transsynaptic Death. In: Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. San Diego: Academic Press, 1997: 111-113.
- (217) Temesvari P, Joo F, Kovacs J, Abraham CS. Ischemia-reperfusion-induced alteration of blood-brain barrier transport in newborn pigs. *Am J Physiol* 1995; 269(2 Pt 2):H750-H751.
- (218) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381):1312-1316.
- (219) Ting P, Masaoka H, Kuroiwa T, Wagner H, Fenton I, Klatzo I. Influence of blood-brain barrier opening to proteins on development of post-ischaemic brain injury. *Neurol Res* 1986; 8(3):146-151.
- (220) Treib J, Haaß A, Schmid-Schönbein H, Fröhlig G. Bedeutung der Hämodynamik beim akuten Hirninfarkt. *Deutsches Ärzteblatt* 1999; 96(9):A-553.
- (221) Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995; 377(6547):340-344.
- (222) Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17(2):543-552.
- (223) Tupper DE, Wallace RB. Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp Warsz* 1980; 40(6):999-1003.
- (224) Uhl E, Pickelmann S, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Systemic application. *Stroke* 1999; 30(4):873-879.
- (225) Uhl E, Pickelmann S, Rohrich F, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. *Stroke* 1999; 30(4):880-886.
- (226) Unterberg A, Wahl M, Baethmann A. Studies of pial vascular permeability [letter]. *Stroke* 1988; 19(10):1306-1307.

- (227) Villringer A, Dirnagl U, Them A, Schurer L, Krombach F, Einhaupl KM. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* 1991; 42(3):305-315.
- (228) Villringer A, Dirnagl U, Them A, Schurer L, Krombach F, Einhaupl KM. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* 1991; 42(3):305-315.
- (229) Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhaupl KM. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 1989; 504(1):159-160.
- (230) Von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres FI, Butcher EC et al. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 1992; 263(4 Pt 2):H1034-H1044.
- (231) Waltz AG. Clinical relevance of models of cerebral ischemia. *Stroke* 1979; 10(2):211-213.
- (232) Wayland H, Johnson PC. Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J Appl Physiol* 1967; 22(2):333-337.
- (233) Weber K. Zentrale und Systemische Veränderungen nach Zerebraler Ischämie bei der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1989.
- (234) Weber K, Baethmann A, Kempfski O. Determinants of survival after forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Metab Brain Dis* 1988; 3(4):247-255.
- (235) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils [see comments]. *N Engl J Med* 1989; 320(6):365-376.
- (236) Welsh FA. Mechanisms of induced tolerance to cerebral ischemia. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1998; 65(6):447-449.
- (237) Williams PC, Stern MD, Bowen PD, Brooks RA, Hammock MK, Bowman RL et al. Mapping of cerebral cortical strokes in Rhesus monkeys by laser Doppler spectroscopy. *Med Res Eng* 1980; 13(2):3-5.
- (238) Witzleb E. Funktionen des Gefäßsystems. In: Schmidt RF, Thews G, editors. *Physiologie des Menschen*. Springer, 1990: 505-572.
- (239) Yamakawa T, Yamaguchi S, Niimi H, Sugiyama I. White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study. *Circ Shock* 1987; 22(4):323-332.
- (240) Yan SF, Mackman N, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(9):2029-2035.
- (241) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(26):15769-15774.
- (242) Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 2000; 863(1-2):94-105.
- (243) Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 8(3):293-302.
- (244) Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat [published erratum appears in *J Neurol Sci* 1994 Oct;126(1):96]. *J Neurol Sci* 1994; 125(1):3-10.

- (245) Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC et al. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res* 1995; 682(1-2):182-188.
- (246) Zhang Z, Davies K, Probst J, Fenstermacher J, Chopp M. Quantitation of microvascular plasma perfusion and neuronal microtubule-associated protein in ischemic mouse brain by laser-scanning confocal microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(1):68-78.
- (247) Zhang ZG, Bower L, Zhang RL, Chen S, Windham JP, Chopp M. Three-dimensional measurement of cerebral microvascular plasma perfusion, glial fibrillary acidic protein and microtubule associated protein-2 immunoreactivity after embolic stroke in rats: a double fluorescent labeled laser-scanning confocal microscopic study. *Brain Res* 1999; 844(1-2):55-66.
- (248) Zhang ZG, Chopp M, Goussev A, Lu D, Morris D, Tsang W et al. Cerebral microvascular obstruction by fibrin is associated with upregulation of PAI-1 acutely after onset of focal embolic ischemia in rats. *J Neurosci* 1999; 19(24):10898-10907.
- (249) Zipfel GJ, Lee JM, Choi DW. Reducing calcium overload in the ischemic brain. *N Engl J Med* 1999; 341(20):1543-1544.

Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, München, in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. med. A. Baethmann durchgeführt. Das Projekt wurde durch Zuwendungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Uh 64/2-1) gefördert.

Herrn Professor Meßmer, dem ehemaligen Direktor, möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut danken. Für seine Förderung und intensive Unterstützung bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Professor Baethmann gilt mein besonderer Dank für die Vergabe des Themas sowie für seine engagierte Betreuung. Unter seiner Anleitung lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Versuchsplanung bis hin zur Auswertung und v. a. die kritische Interpretation von Ergebnissen. Seine Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik war stets Anregung und wertvolle Hilfe.

Herrn Professor Baethmann und Herrn Professor Meßmer möchte ich darüber hinaus für meine Förderung bei der Teilnahme am Austauschprogramm mit der Harvard Universität und die weitere Unterstützung bei meinem beruflichen Werdegang danken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei PD. Dr. med. E. Uhl für seine unermüdliche Hilfe und Anleitung danken. Er begleitete mich auf den ersten Schritten der medizinischen Forschung mit Ratschlägen, praktischen Hilfen und Anmerkungen. Bedanken möchte ich mich nicht nur für die effektive Zusammenarbeit sondern auch für die Freundschaft, die daraus entstanden ist.

Vielen Dank sage ich auch den Assistentinnen und Mitarbeitern des Instituts für den Teamgeist, die gegenseitige Unterstützung und die freundliche Mithilfe bei den Versuchen und den histologischen Auswertungen.

Lebenslauf

Jürgen Beck

<i>Geboren am</i>	28. Januar 1970 in Nördlingen
<i>Familienstand</i>	ledig, keine Kinder
<i>Eltern</i>	Wolfgang Beck, Schriftsetzer Helga Beck, geborene Feldmeier, Schneiderin
<i>Ausbildung</i>	
<i>1976-1980</i>	Grundschule Nördlingen
<i>1980-1989</i>	Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen
<i>1989-1990</i>	Grundwehrdienst bei der 1. Luftwaffensicherungsstaffel Neuburg a.d. Donau
<i>1990-1991</i>	Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Würzburg
<i>1991-1998</i>	Student der Medizin, LMU-München und HMS-Boston
<i>März-November 1996</i>	Stipendium an der Harvard Medical School, Boston, USA
<i>April 1998</i>	Abschluß des Medizinstudiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut)
<i>August-Dezember 1998</i>	Arzt im Praktikum (AiP) an der Neurochirurgischen Klinik, Klinikum Großhadern der Universität München
<i>Januar 1999-Nov. 2000</i>	AiP und Assistent im Institut für Chirurgische Forschung, Arbeitsgruppe für Experimentelle Neurochirurgie von Prof. Dr. A. Baethmann
<i>Februar 2000</i>	Approbation als Arzt
<i>Seit Dezember 2000</i>	Assistent der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt bei Prof. Dr. V. Seifert