

Aus der Neurologischen Klinik der HSK Dr. Horst-Schmidt-Klinik Wiesbaden

(Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard F. Hamann)

und

aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern der Universität München

(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt FRCP)

**Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran bei der
experimentellen zerebralen Ischämie mit Reperfusion**

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

vorgelegt von

Dr. med. K. Helge Martens

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: apl. Prof. Dr. med. Gerhard F. Hamann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J.C. Tonn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Baethmann

Prof. Dr. R. Hickel

Prof. Dr. W. Lange

Prof. Dr. B.F. Becker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. D. Burggraf

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2006

Meiner Frau Christina Martens-Rogall, meinem Sohn Nikolaus Luca
und meinem Vater Dipl. Ing. Klaus W. Martens gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

- 1.1. Allgemeines
 - 1.1.1. Epidemiologie des Schlaganfalls
 - 1.1.2. Therapieziele bei der Behandlung des Schlaganfalls
- 1.2. Die zerebralen Mikrogefäße
 - 1.2.1. Der Aufbau der zerebralen Mikrogefäße
 - 1.2.2. Der histologische Aufbau der Basalmembran
 - 1.2.3. Die Integrität der Mikrostrombahn
 - 1.2.4. Die Schädigung der Basalmembran durch eine zerebrale Ischämie
- 1.3. Der Einfluß der endogenen Plasminogen-Aktivatoren auf die Integrität der Basalmembran
- 1.4. Der Einfluß der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP`s) auf die Integrität der Basalmembran
- 1.5. Einfluß der Hypothermie
 - 1.5.1. Einteilung der Hypothermie in Tiefegrade
 - 1.5.2. Einfluß der Hypothermie auf die Integrität der Basalmembran bei einer zerebralen Ischämie mit Reperfusion
- 1.6. Fragestellungen

2. Material und Methoden

- 2.1. Das Tiermodell
 - 2.1.1. Genehmigung und Finanzierung des Tierversuchsvorhabens
 - 2.1.2. Versuchsbeschreibung und Charakterisierung des Tiermodells
 - 2.1.2.1. Versuchsdurchführung mit Präparationsbeschreibung des chirurgischen Eingriffes während der ersten Phase (3h Ischämie mit Beginn der Induktion der Hypothermie)
 - 2.1.2.2. Versuchsdurchführung mit Präparationsbeschreibung der Induktion der Hypothermie in der zweiten Versuchsphase (Reperusionsphase mit Hypothermie)
 - 2.1.2.3. Meßeinrichtungen und Meßverfahren
 - 2.1.3. Versuchsprotokolle der Tierversuche
- 2.2. Aufarbeitung der gewonnenen Hirnpräparate
 - 2.2.1. Aufarbeitung der Hirne
 - 2.2.2. Die immunhistologische Färbung gegen das Protein Mikrotubulin-assoziiertes-Protein-2 (MAP-2)
 - 2.2.3. Die Infarktgrößenbestimmung (Volumetrie)
 - 2.2.4. Biochemische Aufarbeitung
 - 2.2.4.1. Die Proteinisolierung
 - 2.2.4.2. Western Blot für Kollagen IV und Hämoglobin
 - 2.2.4.3. Gelatinezymographie für Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und -9
 - 2.2.4.4. Plasminogen-abhängige-Kasein-Zymographie
 - 2.2.4.5. Die Coomassie-Blau-Färbung
 - 2.2.4.6. Auswertung der Zymographien und Blottings
- 2.3. Eingesetzte Substanzen
 - 2.3.1. Die Perfusionslösung
 - 2.3.2. Blotto
- 2.4. Statistische Methoden

3. Ergebnisse

- 3.1. Physiologische Parameter
- 3.2. Der Verlauf der Hirntemperatur bei Normo- und Hypothermie
- 3.3. Einfluß der Hypothermie auf das Infarktvolumen
- 3.4. Schutz der Basalmembran durch Hypothermie
- 3.5. Verminderung der Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen aus den zerebralen Gefäßen
- 3.6. Konzentration von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs)
- 3.7. Die Verminderung der enzymatischen Aktivität von endogenen Plasminogen Aktivatoren wie tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA) und u-Plasminogen-Aktivator (u-PA) durch Hypothermie nach einer 3-stündigen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion

4. Diskussion

- 4.1 Allgemein
 - 4.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit
 - 4.1.2. Validität und Grenzen des verwendeten Ischämie Modells
 - 4.1.3. Validität und Grenzen des verwendeten Hypothermie Modells
- 4.2. Spezieller Teil
 - 4.2.1. Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Infarktgröße
 - 4.2.2. Der Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Morphologie und Integrität der mikrovaskulären Basalmembran
 - 4.2.3. Der Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf endogene Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metallo-Proteinasen
- 4.3. Ausblicke

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Danksagungen

8. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

1.1.1. Epidemiologie des Schlaganfalls

Durchschnittlich 150 von 100 000 Einwohnern in der Bundesrepublik Deutschland erleiden jährlich einen Schlaganfall. Dabei entfallen 85% auf einen ischämischen Hirninfarkt und die restlichen 15% erleiden eine intrazerebrale oder subarachnoidale Blutung. Die Wahrscheinlichkeit einen Schlaganfall zu erleiden, nimmt mit dem Lebensalter zu. Bis zum 45. Lebensjahr liegt sie bei 30 pro 100 000 Einwohnern. Ab dem 75. Lebensjahr liegt sie bei etwa 1230 pro 100 000 Einwohnern (Deutsche Schlaganfall Stiftung e.V. 1999).

Die Aussichten einen Schlaganfall ohne bleibenden neurologischen Schaden zu überstehen, sind gering. Etwa ein Viertel (genau 24%) der Patienten sterben innerhalb eines Monats, 42% innerhalb eines Jahres. In der Todesursachenstatistik steht der Schlaganfall an dritter Stelle. Wird der Schlaganfall überlebt, bleiben im überwiegenden Teil der Fälle erhebliche Behinderungen zurück, die mit Einschränkungen im privaten und beruflichen Bereich verbunden sind. Rund 30% der Schlaganfallpatienten müssen ständig gepflegt werden. Abgesehen von der psychischen Belastung für Patienten und Angehörige behindert zu sein, verursacht dies auch immense Kosten, sowohl für die Pflege, wie auch durch den Ausfall der Arbeitskraft des Patienten (Deutsche Schlaganfall Stiftung e.V. 1999).

Diese epidemiologischen Daten machen deutlich, dass die Behandlung des Schlaganfalls verbessert werden muß.

1.1.2. Therapieziele bei der Behandlung des Schlaganfalls

Die wichtigsten, da wirkungsvollsten Faktoren bei der Bekämpfung des Schlaganfalls sind Akutversorgung, Frührehabilitation, Nachsorge und die Prävention.

Dabei kommt der Akutversorgung eine besondere Bedeutung zu. In dieser Phase wird versucht den neurologischen Schaden, d.h. die Zahl der Neurone, die irreparabel geschädigt werden, so gering wie möglich zu halten. Gleichzeitig wird die Ursache des Schlaganfalls ermittelt, um neben der allgemeinen internistischen Stabilisierung des Patienten eine ursachengerichtete Therapie einleiten zu können. Vorherrschendes Ziel hierbei ist es, durch die Verbesserung oder Wiederherstellung der Durchblutung, die Anzahl der Nerven- und Stützzellen die absterben, so gering wie möglich zu halten. Um die Gefahr einer Hämorrhagie zu vermindern, sollte ein zusätzliches Therapieziel sein, die Integrität der Mikrogefäße zu erhalten.

Grundsätzlich kann zwischen dem neurovaskulären und dem neuroprotektiven Therapieansatz unterschieden werden.

Der neuroprotektive Ansatz versucht, mittels pharmakologischer Substanzen z.B. Glutamatantagonisten (Busto et al., 1989) oder mittels Hypothermie (Ishikawa et al., 1999; Krieger et al., 2001) die Ischämieresistenz des Hirngewebes zu steigern. Im Gegensatz zu einer postischämischen Hypothermiebehandlung zeigte bedauerlicherweise keine der pharmakologischen Substanzen, trotz Erfolge im Tierversuch, im klinischen Versuch eine Verbesserung des neurologischen Outcomes der Patienten.

Mit dem neurovaskulären Therapieansatz wird versucht, die Durchblutung in dem betroffenen ischämischen Areal zu steigern, z.B. mittels einer systemischen venösen Thrombolyse mittels rt-PA (recombinant tissue Plasminogen Activator) (National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995) oder mit pharmakologischen Substanzen wie z.B. L-Arginin (Sporer et al., 1997).

Bei der systemischen Thrombolyse wird innerhalb eines dreistündigen Zeitfensters versucht, mit der venösen Verabreichung von rt-PA ein durch einen Thrombus verschlossenes Hirngefäß wieder zu eröffnen und die Durchblutung des betroffenen ischämischen Areals wiederherzustellen. Großangelegte internationale Studien wie z.B. ECASS (European Cooperative Acute Stroke Study) oder NINDS (National Institutes of Neurological Diseases and Stroke) konnten zeigen, dass eine systemische venöse Thrombolyse mit rt-PA innerhalb eines 3- bis 6-stündigen Zeitfensters, das klinisch-neurologische Outcome der Patienten signifikant verbessert (European Cooperative Acute Stroke Study, 1995; National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Jedoch kann die Therapie mit rt-PA auch gravierende Nebenwirkungen wie z. B. einen stummen hämorrhagischen Infarkt (in 4,6-42,1% der Fälle) oder eine parenchymale Hämorrhagie oder ein Hämatom (in bis zu 16% der Fälle) haben (National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Die Auswirkungen einer Hämorrhagie können für den Patienten sehr viel gravierender sein, als es der Schlaganfall alleine gewesen wäre. Der Mechanismus, wie es zu einer Ruptur der Mikrogefäße bzw. dem Verlust der Integrität der Basalmembran kommt, ist im Einzelnen noch ungeklärt. Es konnte jedoch in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein Verlust der Integrität der Basalmembran zu einer hämorrhagischen Transformation führt (Hamann et al., 1995; Hamann et al., 1996).

Aus den dargelegten Gründen sollte es Ziel jeder Schlaganfalltherapie sein, die Integrität der Mikrogefäße und damit deren Funktion zu erhalten.

1.2. Die zerebralen Mikrogefäße

1.2.1. Der Aufbau der zerebralen Mikrogefäße

Die zerebralen Gefäße unterscheiden sich von den Gefäßen in der Körperperipherie. Die Hauptbestandteile der zerebralen Kapillare sind Endothelzellen mit interendothelialen tight-junctions, die Basalmembran, Perizyten und die Astrozyten. Den Aufbau einer Kapillare im Querschnitt betrachtet ist in der Abbildung 1.1 A dargestellt. Lumenwärts kleiden Endothelzellen die Gefäßwand wie eine Tapete lückenlos aus und sind über tight-junctions eng miteinander verbunden. In Gegensatz zu peripheren Kapillaren sind sie nicht fenestriert und bilden über die tight-junctions eine geschlossene, lückenlose Zellschicht. Diesen lückenlosen Verband können weder Blutzellen, noch lösliche Bestandteile des Blutes über 20 kDa frei passieren. Die verknüpften Endothelzellen stellen das morphologische Korrelat für die Blut-Hirn-Schranke dar. Um die Schicht der Endothelzellen liegt die Basalmembran (Der Aufbau der Basalmembran wird in Kapitel 1.2.2 erläutert). Die Endothelzellen sind mit der Basalmembran über Integrine verknüpft. Perizyten (kontraktile Zellen) treten im Gehirn im Gegensatz zu anderen Geweben besonders zahlreich auf. Ihre Funktion ist teilweise noch ungeklärt. Es wird ihnen eine Abwehrfunktion zugeschrieben. Sie umklammern die Endothelzellen mit ihren Ausläufern und sind gemeinsam mit diesen in die aus feinsten Fasern bestehende Basalmembran eingebettet. Astrozyten umfassen mit ihren Endfüßchen die Endothelzellen und die Perizyten einschließlich der Basalmembran. Über die Funktion der Astrozyten ist wenig bekannt. Vermutlich sondern sie Wachstumsfaktoren ab, die für die Differenzierung des Endothels bedeutsam sind (siehe Abbildung 1.1. A und B).

Abbildung 1.1. A und B

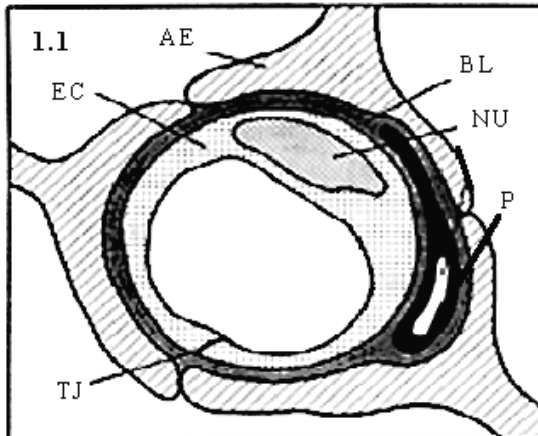


Abb. 1.1.A: Querschnitt durch eine zerebrale Kapillare.

EC: Endothelzelle
 TJ: interendotheliale tight-junction
 BL: Basalmembran
 P: Perizyt
 AE: Astrozytenfortsatz

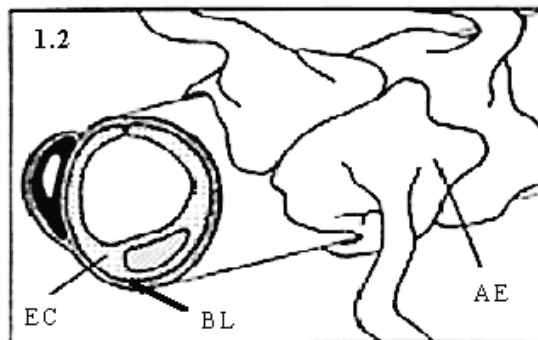
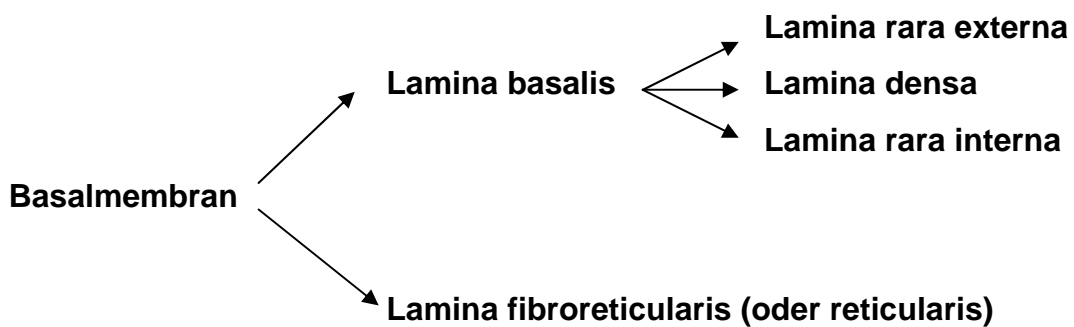


Abb. 1.1.B: Längs/Querschnitt durch eine zerebrale Kapillare

EC: Endothelzelle
 BL: Basalmembran
 AE: Astrozytenfortsätze

1.2.2. Der histologische Aufbau der Basalmembran

Die Basalmembran (Terminologia histologica: Membrana basalis) zeigt sich unter dem Lichtmikroskop als homogene Schicht im Extrazellularraum. Sie liegt bei den zerebralen Mikrogefäßen zwischen den Endothelzellen und den Peri- und Astrozyten und ist mit diesen Strukturen vernetzt. Die im Lichtmikroskop homogen erscheinende „Membran“ (daher der Name), kann elektronenmikroskopisch weiter untergliedert werden.



Da schon die Basallamina über 50 verschiedene Glykoproteine und mehrere Proteoglykane enthält, werden hier nur die wesentlichsten Komponenten erwähnt. Einige der Baustoffe werden von Bindegewebszellen, andere von den benachbarten Endothelzellen und wenige von weiter entfernt liegenden Zellen synthetisiert.

Die direkt an das Endothel angrenzende Lamina rara externa (oder lucida) ist der oberste Teil der Basallamina und zwischen 10 bis 50 nm breit. In die Lamina rara externa reichen die extrazellulären Enden der alpha6-beta4-Integrine von Hemidesmosomen, der Zelloberflächenrezeptorproteine (CD 44-Rezeptor und Lamininrezeptor) und die Integrine der Adhäsionsplaques hinein, an denen Ankerfilamente angeknüpft sind. Dabei handelt es sich um Kalinin, Nectin, Laminin-5, Epiligin und das 19DEJ1-Antigen, an den CD 44 Rezeptor gebundene Hyaluronsäure, an verschiedene Lamininrezeptoren geknüpftes Perlecan, Thrombospondin und Laminine bzw. an die Alpha-Untereinheit des Integrins angeknüpftes Fibronectin. Ferner findet sich hier von der Zellmembran bis in die Lamina densa herabreichendes Syndecan, Basalmembranproteoglykan hoher Dichte, Kollagen IV und Heparin/Heparansulfat.

In der Lamina densa findet sich besonders Kollagen IV, Heparansulfatproteoglykan und Chondroitin-6-sulfatproteoglykan.

In der Lamina rara interna sind Kollagen VII, Fibronectin und Thrombospondin sowie Hyaluronsäure die häufigsten Komponenten. Besonders das Fibronectin, neben Kollagen und Thrombospondin, sorgt für die Verknüpfung mit der Lamina fibroreticularis.

Die Lamina fibroreticularis oder reticularis findet sich nicht in allen Lokalisationen. So fehlt diese Schicht in der Basalmembran der Nierenglomeruli, in der Linsenkapsel und in den transversalen Tubuli der Herzmuskelzellen, da hier kein Bindegewebe unterhalb der Basallamina zu finden ist. Neben den relativ dicken Kollagen I- und Kollagen III-Fasern finden sich in der Lamina fibroreticularis als wesentliche Komponenten Fibrillin-Makrofibrillen, Kollagen VII-Ankerfibrillen, Kollagen IV-Verankerungsplaques, Decorin, Fibromodulin, Biglykan und Fibronectin. (Quelle: Dr. Jastrows EM-Atlas).

Die Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße (siehe Abbildung 1.2) besteht aus einem durch das Protein Entaktin verbundenen Geflecht aus Kollagen Typ IV und Lamininpolymeren (Martinez-Hernandez et Amento, 1986; Mohan et Schittny, 1990; Yurchenko et Schittny, 1990). Als ein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist die Basalmembran über zelluläres Fibronectin an die Parenchymzellen und über Laminin mit den Endothelzellen verbunden (Martinez-Hernandez et Amento, 1983; Bruijn et al., 1988). Die zerebrovaskuläre extrazelluläre Matrix und die Basalmembran sind mit den perivaskulären Astrozyten und Perizyten verbunden (Peters et al., 1991). Die Basalmembran alleine, ohne die Endothelzellen, stellt eine massive Barriere für die korpuskulären und nichtkorpuskulären Blutbestandteile dar und verhindert die

Transmigration der polymorphkernigen Leukozyten (Mainardi et al., 1980; Heck et al., 1990; Granger et al., 1995).

Abbildung 1.2

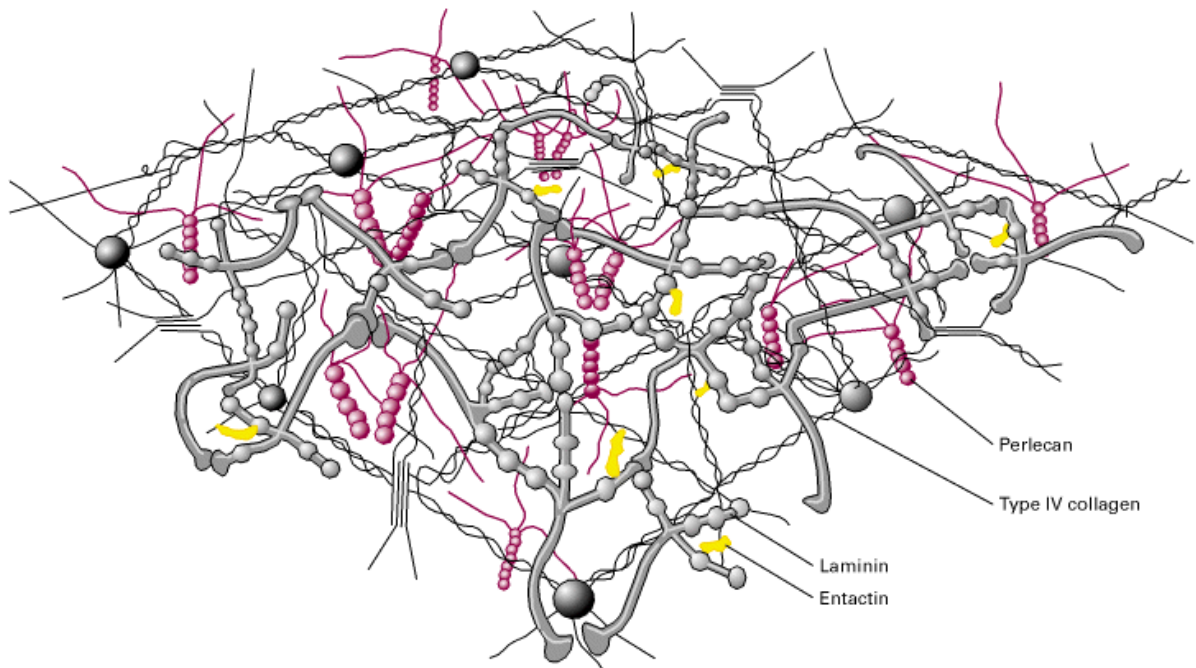


Abbildung 1.2:

Schematische Darstellung der Hauptbestandteile der Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße

1.2.3. Die Integrität der zerebralen Mikrostrombahn

Die Integrität der zerebralen Mikrostrombahn ist für die Funktion des Gehirnes essentiell. Zur sogenannten Mikrostrombahn zählen alle zerebralen Gefäße mit einem Durchmesser unter 100µm.

Die Integrität der zerebralen Mikrogefäße wird hauptsächlich durch drei verschiedene Mechanismen gewährleistet. Morphologisch sind drei verschiedene Strukturen oder Barrieren an der Aufrechterhaltung der Integrität beteiligt.

Die sogenannte Blut-Hirn-Schranke stellt die erste Barriere dar. Ihr strukturelles Korrelat besteht aus den Endothelzellen, die über inter-endotheliale tight-junctions eine lückenlose Zellschicht bilden und die Gefäßwand auskleiden. Die Blut-Hirn-Schranke regelt vor allem den Stofftransport und ist essentiell als Scheide zwischen dem Blut- und dem Hirnkompartiment (Gregoire, 1989).

Die zweite strukturelle Barriere bildet die Basalmembran. Sie bildet, wenn die Endothelbarriere durch eine Ischämie zerstört worden ist, eine zweite strukturelle Barriere

und kann die Extravasation von zellulären Blutbestandteilen verhindern. Zusätzlich bildet sie ein Diffusionshindernis aufgrund der Proteinladung der in der Basalmembran eingelassenen Proteine (Hamann et al., 1995).

Die dritte strukturelle Barriere, die jedoch funktionell wenig widerstandsfähig ist, bilden die in die Basalmembran eingelassenen Perizyten und die perivaskulären Astrozyten (Risau et al., 1986).

Die einzelnen Barrieren sind funktionell gesehen eine Einheit, die das Hirn- von dem Blutkompartiment trennt und so erst seine Funktion ermöglicht. Die einzelnen Bestandteile beeinflussen sich untereinander. Die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke und den Basalmembrankomponenten ist stark abhängig vom Wechselspiel zwischen Endothelzellen und Astrozyten. Die Integrität und die Verbindung zwischen Endothelzellen und extrazellulärer Matrix und die Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix und Astrozyten werden über sog. Integrine (Zellmatrix-Adhaesions-Moleküle) gewährleistet (Hamann et al., 1999).

Kommt es zur Zerstörung der Endothelzellbarriere und zur Degradation der Basalmembran mit darumliegender extrazellulärer Matrix durch eine zerebrale Ischämie können Blutplasma und auch zelluläre Blutbestandteile in das umgebene Hirngewebe extravasieren. Dies zieht neben der Unterversorgung der Neurone mit Sauerstoff und Substraten weitere Schäden für das Hirngewebe nach sich.

1.2.4. Die Schädigung der Basalmembran durch eine zerebrale Ischämie

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, vermitteln die Blut-Hirn-Schranke, die Basalmembran, Perizyten und perivaskuläre Astrozyten die Integrität der Mikrogefäße.

Bei einer Ischämie stellen nach dem Untergang der Blut-Hirn-Schranke die Basalmembran und die Peri- und Astrozyten die einzige Barriere zwischen Blut und Hirnparenchym dar. Durch sie kann eine Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen ins Parenchym und die nachfolgende Ausbildung eines intrazerebralen Ödems verhindert werden (Hamann et al., 1995, Hamann et al., 1996).

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte an Primaten gezeigt werden, dass die Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin bei einer 3-stündigen zerebralen Ischämie mit nachfolgender 24-stündiger Reperfusion abgebaut bzw. verdaut werden und es zu einem Ausblassen und einer Reduktion der zerebralen Gefäße kommt (Hamann et al., 1995). Die gleichen Ergebnisse konnten nicht nur an Primaten, sondern auch an der Ratte gezeigt werden (Hamann et al., 2002) (siehe Abbildung 1.3 und 1.4a, b).

Abbildung 1.3

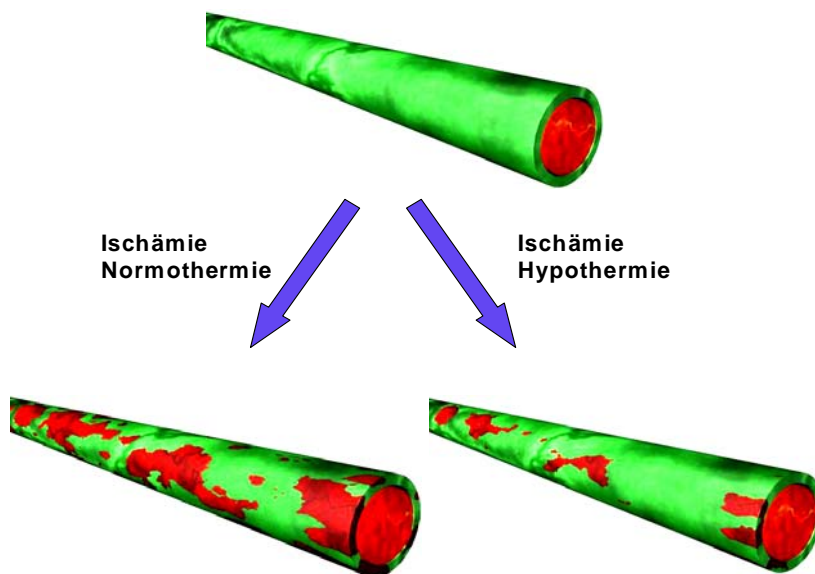
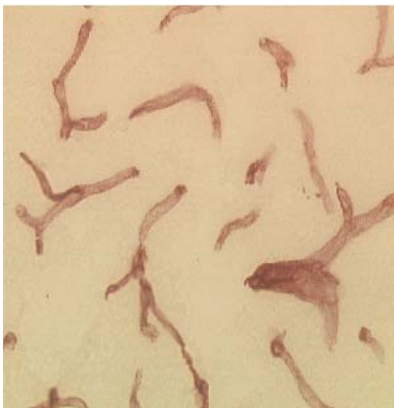


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des ischämischen Schadens einer zerebralen Kapillare in Normthermie (linke Bildhälfte). Bei einer Hypothermie ist der ischämische Schaden weniger ausgeprägt (rechte Bildhälfte).

Abbildung 1.4a,b

1.4. a



1.4. b

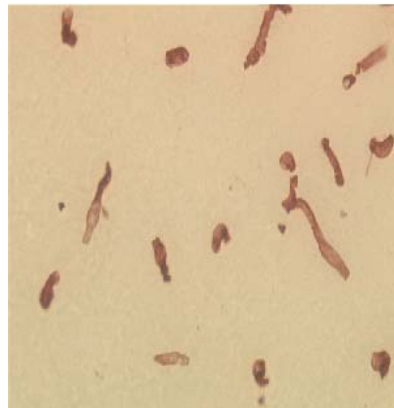


Abbildung 1.4a,b: Mikrophotographie der Basalganglien der Ratte (Vergrößerung 400fach)

1.4 A: Kontrollbereich (nicht-ischämisch): Man sieht mehrere Mikrogefäße, die mit einer Peroxidasemarkierung für Kollagen Typ IV gefärbt wurden.

1.4 B: Nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion: Deutliche Gefäßrarefizierung und Ausbleichen der Kollagenmarkierungen.

(Hamann et al., 2002)

Die Mechanismen, die zu dieser Degradation der Bestandteile der Basalmembran führen, sind nur in Ansätzen verstanden (del Zoppo et al., 1998; Hamann et al., 1999; Petty et Wettstein, 2001). Zumindest drei bekannte Mechanismen können zur Zerstörung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beitragen. Diese drei Mechanismen sind die Aktivierung von Plasmin, die Freisetzung von Matrix-Metallo-Proteinasen vorwiegend aus Astrozyten und Endothelzellen und die Freisetzung von Granula mit proteolytisch wirksamen Enzymen aus polymorphkernigen Leukozyten (PMN-Leukozyten).

Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch endogene oder auch exogen zugeführte Plasminogenaktivatoren kann zur Schädigung der Basalmembran beitragen. Das Hauptsubstrat von Plasmin ist Laminin, welches eine wesentliche Matrixkomponente der Basalmembran bildet (Hamann et al., 1995). Zusätzlich ist Plasmin in der Lage die membrangebundenen Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-1 und MMP-3 zu aktivieren. Diese könnten wiederum als membrangebundene Formen die Sezernierung von freien MMPs (z.B. MMP-2 und MMP-9) fortsetzen. Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) sind in der Lage eine andere Hauptkomponente der Basalmembran Kollagen IV zu spalten und somit zur Schädigung beizutragen (Heo et al., 1999; Rosenberg et al., 1998). Die inflammatorische Reaktion mit Freisetzung von Leukozyten-Granula aus PMN-Leukozyten mit verschiedenen Proteasen wie Kollagenasen, Gelatinasen, Elastasen und Cathepsin-B, könnte eine schneeballartige Zerstörung der Basalmembranstrukturen hervorrufen (Petty et Wettstein, 2001). Von allen diesen Proteasen ist bekannt, dass sie die Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen IV, Laminin und Fibronectin abbauen können.

1.3. Der Einfluß der endogenen Plasminogen-Aktivatoren auf die Integrität der Basalmembran

Ein möglicher Schädigungsmechanismus der Basalmembran wäre durch endogene Plasminogenaktivatoren wie t-PA und u-PA aktiviertes Plasmin.

Die derzeit einzig zugelassene interventionelle Akuttherapie bei einer zerebralen Ischämie ist die intravenöse systemische Thrombolyse mittels des Fibrinolytikums rt-PA (recombinant-tissue-Plasminogen-Activator) innerhalb eines 3- bis 6-stündigen Zeitintervalls nach Ischämiebeginn. Große internationale klinische Studien zeigen einerseits eine signifikante Verbesserung des neurologischen Outcomes, andererseits steigt die Rate der gravierenden Nebenwirkungen z.B. in Form von Hämorrhagien um ca.

20-30% signifikant an (NINDS: The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; ECASS: European Cooperative Akute Stroke Study Group, 1995).

Wie die Matrix-Metallo-Proteinase wird Plasmin, eine breitwirksame unspezifische Serinprotease, als inaktive Proform sezerniert. Einmal aktiviert, ist sie fähig, eine Vielzahl von Proteinen zu hydrolysieren und zu spalten. Zu diesen zählen auch die Proteine der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Fibrin, Fibronectin und Laminin. Die Aktivierung des Proenzym Plasminogen zu Plasmin ist durch mehrere Faktoren möglich. Endogene Plasminogen-Aktivatoren wie Urokinase- (u-PA) und tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA) können Plasminogen in Plasmin umwandeln (Rijken, 1995). Eine Erhöhung der t-PA- und der u-PA-Konzentration wurde bei experimenteller zerebraler Ischämie beschrieben (t-PA: Wang et al., 1998; u-PA: Rosenberg et al., 1996). In der Literatur wurde die Vermutung geäußert, dass diese lokale Erhöhung der Synthese und Ausschüttung von u-PA und t-PA einen Einfluß auf das Ausmaß des mikrovaskulären Schadens haben könnte (Schreiber et al., 1998; Ahn et al., 1999; Rosenberg, 1999). Dabei wird t-PA eher die Rolle bei der Generierung von Plasmin für die Fibrinolyse einschließlich der Lyse des Thrombus zugeschrieben. U-PA scheint vorrangig bei der Proteolyse von Zelloberflächen, in der Degradation der Extrazellulärmatrix und der Zellinvasion beteiligt zu sein. Jedoch stellt sich die Frage, ob diese strikte Einteilung den biologischen Vorgängen gerecht wird (Blasi et al., 1987).

Hamann et al. konnten zeigen, dass der Verlust der Proteine Kollagen und Laminin bei einer zerebralen Ischämie zum Verlust der Integrität der Basalmembran und damit letztendlich zu einer Hämorrhagie führt (Hamann et al., 1995; Hamann et al., 1996; Hamann et al., 2002). Desweiteren konnten Burggraf et al. bei der Ratte zeigen, dass niedrig bis moderat dosiertes rt-PA (0,9-9 mg/kg KG) den Verlust von Kollagen aus der Basalmembran vermindert. Eine höhere Dosierung von rt-PA (18mg/kg KG) verstärkte jedoch den mikrovaskulären Schaden. Dies könnte durch die gleichzeitig beobachtete Erhöhung und Koaktivierung von MMP-2 und MMP-9 verursacht werden (Burggraf et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Gabe von rt-PA die Konzentration und Aktivität von u-PA signifikant erhöht. Dabei führte die Erhöhung der Konzentration von rt-PA zu einer Erhöhung der Aktivität von u-PA. Die Erhöhung trat besonders in den Basalganglien, jedoch auch im Cortex auf. Eine Erhöhung der Konzentration und Aktivität von endogenem t-PA findet nicht oder kaum statt (Burggraf et al., 2004). Diese Ergebnisse werden von Grobholz et al. und Hosomi et al. bestätigt (Grobholz et al., 2005; Hosomi et al., 2001). Auch andere Gruppen konnten die Erhöhung von u-PA, nicht jedoch die Antwort von t-PA auf eine zerebrale Ischämie nachvollziehen (Wang et al., 1998; Ahn et al., 1999; Rosenberg et al., 1999).

Trotz dieser Ergebnisse bleibt der genaue Schädigungsmechanismus der endogenen Plasminogen-Aktivatoren auf die mikrovaskuläre Integrität der Basalmembran unklar.

1.4. Der Einfluß der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP`s) auf die Integrität der Basalmembran

Wie schon ausgeführt, wäre die Familie der Matrix-Metallo-Proteinasen ein möglicher nichtzellulärer Schädigungsfaktor der Basalmembran bei einer zerebralen Ischämie. Diese Zn²⁺-Endopeptidasen werden als inaktive Proform (Pro-MMP) sezerniert. Um ihre biologische proteolytische Wirkung zu entfalten müssen sie erst aktiviert werden. Um eine überschießende Proteolyse zu verhindern, werden die MMP`s durch spezifische gewebeständige Inhibitoren, als TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinasis) bezeichnet, gehemmt (Nagase, 1997).

Yang und Betz konnten an Sprague-Dawley Ratten zeigen, dass nach einer zweistündigen Okklusion der Arteria cerebri media (MCA-Okklusion) und drei Stunden Reperfusion ein erstes initiales Öffnen der Blut-Hirn-Schranke und eine Störung der Integrität der Gefäße auftritt (Yang et Betz, 1994). Nach 48 Stunden Reperfusion tritt ein zweites und maximales Öffnen der Blut-Hirn-Schranke auf (Belayev et al., 1996). Welche Faktoren für diese Schädigung der Integrität der Mikrogefäße verantwortlich sind, ist derzeit noch nicht endgültig geklärt.

Von besonderem Interesse scheinen hierbei MMP-2 (Gelatinase A, 72-kDa Typ IV Kollagenase) und MMP-9 (Gelatinase B, 92-kDa Typ IV Kollagenase) zu sein. Immunohistochemische Ergebnisse und Ergebnisse aus einem in situ Gelatine overlay aus unserer Arbeitsgruppe zeigen eine Erhöhung der MMP-2- und MMP-9-Aktivität und Co-Lokalisation mit dem Infarktareal bei einer 3-stündigen Ischämie mit 48-stündiger Reperfusion bei der Ratte (Loy et al., 2002).

Bei einer permanenten Ischämie bei spontan hypertensiven Ratten zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Pro-MMP-9 nach zwölf Stunden Ischämie, die bis 24 Stunden nach der Ischämie erhöht blieb. Eine Erhöhung des Pro-MMP-2 konnte erst nach 5 Tagen gezeigt werden (Rosenberg et al., 1996). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Romanic et al.. So konnte eine Steigerung der Expression von Pro-MMP-9 innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach einer permanenten Ischämie in Endothelzellen und bei neutrophilen Zellen innerhalb und im Randsaum der ischämischen Läsion gezeigt werden. Dabei konnten zuerst ein Auftreten von Pro-MMP-9 und danach erst das Auftreten von Pro-MMP-2 nachgewiesen werden (Romanic et al., 1998). Eine intravenöse Applikation eines neutralisierenden Antikörpers gegen MMP-9 eine Stunde vor Ischämiebeginn reduzierte das Infarktvolumen um 30% (Romanic et al., 1998). Gasche et al. berichten von einem

Anstieg der Pro-MMP-9 Expression bei Mäusen zwei Stunden nach Beginn einer permanenten Ischämie. Dieser zymographisch nachgewiesene Anstieg blieb für 24 Stunden bestehen. Aktiviertes MMP-9 konnte vier Stunden nach Ischämiebeginn nachgewiesen werden. Zu dieser Zeit läßt sich durch die Extravasation von Evan`s Blau eine Ruptur der Blut-Hirn-Schranke nachweisen. Im Gegensatz dazu läßt sich eine Erhöhung von Pro-MMP-2 erst 24 Stunden nach Ischämiebeginn nachweisen (Gasche et al., 1999). Bei einer 60-minütigen transienten Ischämie mit Reperfusion bei Mäusen konnte drei Stunden nach Ischämiebeginn eine noch frühere Erhöhung von aktiviertem MMP-9 und der Ruptur der Basalmembran beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine sehr frühe Erhöhung von Pro-MMP-9 nach einer Stunde postischämisch und eine späte Erhöhung von Pro-MMP-9 23 h nach Ischämiebeginn (Fujimura et al., 1999). Bei Mäusen war nach einer permanenten Okklusion der Arteria cerebri media (MCA-O) sowohl der Protein- wie auch der mRNA-Wert von MMP-9 hochreguliert. So konnte Asahi et al. an MMP-9-knock-out-Mäusen zeigen, dass diese kleinere Infarkte als ihre Wildtyp-Vertreter hatten. Im Gegensatz zu den MMP-9-knock-out-Mäusen konnte durch den unspezifischen und breit wirksamen MMP-Inhibitor BB-94 die Infarktgröße bei Wildtyp-Mäusen verringert werden (Asahi et al., 2000).

Obwohl viele Untersuchungen über den Einfluß der MMP bei einer Ischämie durchgeführt wurden, ist der genaue Mechanismus weiterhin unklar.

1.5. Einfluß der Hypothermie

1.5.1. Einteilung der Hypothermie in Schweregrade

Die Körperkerntemperatur liegt normalerweise zwischen 36,5 und 37,5°C (Normothermie). Liegt die Temperatur darunter, wird dies als Hypothermie bezeichnet. In der Literatur wird die Tiefe einer Hypothermie in drei verschiedene Grade (mild, moderat und schwer) eingeteilt. Bei einer milden Hypothermie liegt die Temperatur definitionsgemäß zwischen 32,5 und 36,4°C und bei einer moderaten Hypothermie zwischen 29,5 und 32,4°C. Fällt die Temperatur unter 29,4°C spricht man von einer schweren Hypothermie (Krieger et al., 2001).

In der hier vorgestellten Arbeit wurde für die Untersuchungen der Temperaturbereich einer milden bis moderaten Hypothermie gewählt, d.h. bei den Versuchstieren wurde eine Hypothermie induziert, die zwischen 31 und 34°C lag. Dies hatte verschiedene Gründe technischer und ethischer Natur und wird im Diskussionsteil ausführlicher erläutert.

1.5.2. Einfluß der Hypothermie auf die Integrität der Basalmembran bei einer zerebralen Ischämie mit Reperfusion

Der Effekt, dass eine Hypothermie die Ischämietoleranz und somit das Ausmaß des ischämischen Schadens vermindert, ist schon lange bekannt und wird in der Medizin z.B. bei Transplantationen genutzt (Ginsberg et al., 1992). Die Verminderung des ischämischen Schadens durch eine Hypothermie wird einerseits durch die allgemeine Verminderung des Metabolismus, andererseits durch Hemmung oder Unterdrückung spezifischer Schädigungsmechanismen erreicht (Ginsberg et al., 1992).

Es konnte in experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Hypothermie die Infarktgröße bei einer fokalen zerebralen Ischämie signifikant reduzieren kann (Maier et al., 1998; Yanamoto et al., 2001). Diese Infarktreaktion konnte mittlerweile auch in klinischen Studien bei Menschen nachvollzogen werden, wobei die Tiefe (milde, moderate oder schwere Hypothermie), der ideale Zeitpunkt und die Länge der postischämischen Hypothermie noch Gegenstand heftiger Diskussion ist (Krieger et al., 2001; Maier et al., 1998). Die Reduzierung der Infarktgröße wird einerseits sicher durch die Reduzierung des Stoffwechsels und dem damit verbundenen geringeren Bedarf an Sauerstoff verursacht sein. Andererseits ist der Einfluß spezifischerer Schädigungsmechanismen in der Diskussion. Ein möglicher Schädigungsmechanismus wäre die postischämische Inflammation. So konnte in experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine postischämische Hypothermie die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, die für den sekundären postischämischen Hirnschaden verantwortlich gemacht werden, signifikant vermindert (Ishikawa et al., 1999). Ein anderer Schädigungsmechanismus der den postischämischen Hirnschaden verursachen könnte, wäre die übermäßige Bildung von freien Sauerstoffradikalen. In der Untersuchung von Globus et al. konnte gezeigt werden, dass eine postischämische Hypothermie die Bildung von freien Sauerstoffradikalen signifikant unterdrückt (Globus et al., 1995).

Wenig ist über den Einfluß der postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran und die mikrovaskuläre Integrität der Hirngefäße bei einer zerebralen Ischämie bekannt. In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine postischämische Hyperthermie d.h. eine Erhöhung der Hirntemperatur, zu einem früheren und ausgeprägteren Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt (Ginsberg et al., 1992). Auch konnte in der Untersuchung von Ishikawa et al. gezeigt werden, dass bei einer postischämischen Hypothermie die Adhäsion der Leukozyten an die Basalmembran und somit wahrscheinlich die dadurch verursachte Schädigung der Basalmembran vermindert wurde (Ishikawa et al., 1999).

Der mögliche schädigende Einfluß des Plasmins und der Matrix-Metallo-Proteinasen auf die Basalmembran wurde im Kapitel 1.3 und 1.4 beschrieben. Ein möglicher protektiver

Mechanismus einer postischämischen Hypothermie wäre die allgemeine Verminderung der Enzymkinetik d.h. einen Einfluß auf die verminderte Umwandlung von inaktiven in aktive Formen der MMPs und eine verminderte Bildung von Plasmin aus Plasminogen. Ob darüber hinaus noch ein spezifischerer Einfluß der postischämischen Hypothermie auf die MMPs und das Plasmin existiert ist derzeit unklar.

Ziel dieser Studie war es, bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie, den Einfluß einer milden bis moderaten postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran und die mikrovaskuläre Integrität zu untersuchen.

1.6. Fragestellungen

Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hamann konnte der negative Einfluß einer 3-stündigen zerebralen Ischämie mit anschließender 24-stündiger Reperfusion auf die mikrovaskuläre Integrität der Basalmembran bei Primaten und bei der Ratte gezeigt werden. Desweiteren konnten als mögliche Ursachen für die Schädigung der Basalmembran die Aktivierung von Plasmin aus Plasminogen und die Matrix-Metallo-Proteinase identifiziert werden. In den Untersuchungen von Yanamoto et al. wurde der protektive Effekt einer moderaten Hypothermie auf die Infarktgröße und auf das neurologische Outcome nach einer zerebralen Ischämie mit Reperfusion gezeigt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß einer milden bis moderaten postischämischen Hypothermie auf die mikrovaskuläre Integrität der Basalmembran bei einer 3-stündigen transienten fokalen zerebralen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion zu zeigen.

- 1.) Können die Ergebnisse von Yanamoto et al. in Bezug auf eine Reduktion der Infarktgröße bei postischämischer Hypothermie auch bei einem Ratten-Modell der 3-stündigen transienten fokalen zerebralen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion und postischämischer 24-stündiger Hypothermie nachvollzogen werden?
- 2.) Wie sieht der kontinuierliche Verlauf der Hirntemperatur in Bezug auf die Umgebungstemperatur bei einer 3-stündigen transienten fokalen zerebralen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion und postischämischer 24-stündiger Hypothermie oder Normothermie aus?
- 3.) Wie beeinflusst eine postischämische 24-stündige Hypothermie die morphologische Integrität der Basalmembran bzw. den Gehalt der Basalmembran der zerebralen Mikrostrombahn an Kollagen Typ IV? Gibt es einen Unterschied zwischen Cortex und den Basalganglien? Lässt sich die Basalmembran durch eine Hypothermie schützen?
- 4.) Welchen Einfluß hat eine postischämische 24-stündige Hypothermie auf die funktionelle Integrität der Basalmembran in Bezug auf die Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen z.B. Erythrozyten (Nachweis von Hämoglobin als

Ausdruck der korpuskulären Extravasation) in das Hirnparenchym? Unterscheidet sich die Rate der Extravasation zwischen Cortex und Basalganglien?

- 5.) Wie beeinflusst eine postischämische Hypothermie mögliche Schädigungsfaktoren der Integrität der Basalmembran wie Plasminogen-Aktivatoren oder Matrix-Metallo-Proteinasen? Wie verhalten sich die Enzymaktivitäten der Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und MMP-9 nach Hypothermie? Welchen Einfluß hat die Hypothermie auf die Enzymaktivität auf die Plasminogen-Aktivatoren t-PA und u-PA? Gibt es Unterschiede zwischen Cortex und Basalganglien?

2. Material und Methoden

2.1. Das Tiermodell

2.1.1. Genehmigung und Finanzierung des Tierversuchsvorhabens

Alle hier beschriebenen Tierversuche wurden vor der Durchführung bei der Regierung von Oberbayern beantragt und unter dem Tierversuchs-Aktenzeichen Az. 211-2531/48/98 uneingeschränkt genehmigt.

Außerdem unterlagen alle hier durchgeführten Tierversuche den Animal-Protection-Guidelines der American Heart Association.

Die hier vorgelegte Studie wurde vom Kompetenznetzwerk Schlaganfall des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert. Zusätzliche Finanzmittel wurden von der Firma Radiant Medical Incorporation, Redwood City, California zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Versuchsbeschreibung und Charakterisierung des Tiermodells

Bei dieser Untersuchung wurden zwei Tiermodelle kombiniert und diese für unsere Zwecke adaptiert und modifiziert. Es wurden das intraluminale Fadenokklusionmodell nach Zea Longa (Zea Longa et al., 1989) als Ischämiemodell der Ratte und als Hypothermiemodell das Modell der extrakorporalen Kühlung nach Yanamoto et al. (Yanamoto et al., 2001) verwendet, kombiniert und modifiziert.

Der gesamte Versuch erstreckte sich über 25 Stunden und gliederte sich in zwei Hauptphasen. Die erste Hauptphase war die Phase der dreistündigen zerebralen Ischämie und die zweite Hauptphase bestand aus der 24-stündigen Reperfusion mit Hypothermie oder Normothermie über 24 Stunden.

Der zeitliche Verlauf des Versuches bestand aus einer dreistündigen zerebralen Ischämie gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusionphase. Die Hypothermie bzw. der Beginn der Absenkung der Hirntemperatur begann nach zwei Stunden Ischämie durch extrakorporale Kühlung und überlappte sowohl das Ende der Ischämie sowie auch den Beginn der Reperfusion. Es wurde das Hypothermiemodell durch extrakorporale Kühlung von Yanamoto et al. (Yanamoto et al., 2001) verwendet, das geringfügig von uns modifiziert wurde. Nach durchschnittlich einer Stunde war die Hirntemperatur in den Bereich einer milden bis moderaten Hypothermie (31°C bis 34°C) abgesunken. Die Hypothermie bestand für 24 Stunden während der gesamten Reperfusion. Nach 24-stündiger Reperfusion und Hypothermie wurde der Versuch beendet, die Gehirne der Tiere entnommen und einer histologischen und biochemischen Aufarbeitung zugeführt.

Abbildung 2.1: Zeitlicher Verlauf des gesamten Versuches**3 h Ischämie****24 h Hypothermie/Normothermie****24 h Reperfusion****2.1.2.1. Versuchsdurchführung mit Beschreibung des chirurgischen Eingriffes während der ersten Phase (3h Ischämie mit Beginn der Induktion der Hypothermie)**

Die Untersuchungen wurden an erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 300g bis 350g (Charles River Deutschland; Sulzfeld) durchgeführt.

Die Tiere wurden durch eine Inhalationsnarkose mit Intubation mit einem Isofluran[®] (1,7%) /Lachgas (0,2L/min)/Sauerstoff (0,5L/min)/Stickstoff-(Rest)-Gemisch (Linde Technische Gase, München, Deutschland) anästhesiert. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden im Versuchsverlauf regelmäßig mechanische Schmerzreize gesetzt. Bei Abwehrreaktionen und Blutdruckschwankungen wurde die Isofluran-[®] und die Lachgaskonzentration angepasst. Ferner wurde vor jeder Hautinzision eine 1%-ige Lidocainlösung in das entsprechende subkutane Gewebe injiziert.

Zur Intubation wurden die Tiere mit einer Äthernarkose leicht sediert bei erhaltener Spontanatmung, jedoch erloschenen Schutzreflexen. Nach erfolgter Anästhesie wurden die Ratten mit einer adaptierten grauen Braunüle (BD Venflon[®] Pro 16 Gauge, Helsingborg, Schweden) als Tubus intubiert. Fortan wurden die Tiere mechanisch mit dem Isofluran[®]/Lachgas/Sauerstoff-Gemisch beatmet (Harvard small animal ventilator, Modell 683, South Natick, MA, USA). Zur kontinuierlichen Überwachung der künstlichen Ventilation wurde ein Infrarot-CO₂-Meßgerät (Heyer, Modell 2200, Bad Ems, Deutschland) eingesetzt, das den Kohlendioxidgehalt in der ausgeatmeten Luft fortlaufend registrierte. Dieser endexpiratorische P_aCO₂ wurde während des gesamten Versuchs - falls notwendig - durch Veränderung der Atemfrequenz und -seltener- des Atemvolumens im Bereich von 30-35 mm Hg gehalten.

Nach Beginn der kontrollierten Beatmung wurden die Arteria analis und die Vena jugularis externa mit Polyethylen-Schläuchen (PE 50) kanüliert. Über den Arteria-analis-Katheter wurden zum einen der systemische arterielle Blutdruck (SAP) mit einem Statham P23 Druckwandler aufgezeichnet, zum anderen Blutproben zur Blutgasanalyse abgenommen (Bestimmung von P_aO₂, P_aCO₂ und pH mit dem Blutgasanalysator IL 1304; Instrumentations Laboratories, Kirchheim, Deutschland). Über den Vena-jugularis-

externa-Katheter wurde zur Flüssigkeitssubstitution 0,9%-ige Kochsalzlösung mit einer Präzisionsinfusionspumpe infundiert (1ml/h; Precidor, Typ 5003, Infors AG, Bottmingen, Schweiz).

Die Körperkerntemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mit Hilfe eines regulierbaren Heizkissens in einem Bereich von 37.0 und 37.5 °C gehalten. Eine Stunde vor Ischämieende wurde durch externe Kühlung des Versuchstieres die Hirn- und Körperkerntemperatur abgesenkt und so eine milde bis moderate Hypothermie erzeugt.

Über einen 1cm langen Hautschnitt über dem linken Muskulus temporalis wurde der Muskel dargestellt, stumpf bis zum Os temporale gespalten und die Temperatursonde (M5, Greisinger Electronics, Deutschland) eingelegt und mit einer Naht gesichert. Der Versorgungsdraht der Temperatursonde wurde unter der Haut von präaurikulär nach dorsal zwischen die Schulterblätter geführt und trat dort in das „Infusionsjäckchen“ (small-rodent-jacket, Harward Apparatus, USA) ein und wurde von diesem über eine am „Jäckchen“ befestigte flexible Spiralanterie aus dem Versuchskäfig ausgeleitet. Das „Jäckchen“ hatte die Aufgabe zu verhindern, dass das Versuchstier sich im wachen Zustand von der Temperatursonde befreite und sich so möglicherweise verletzte.

Abbildung 2.2

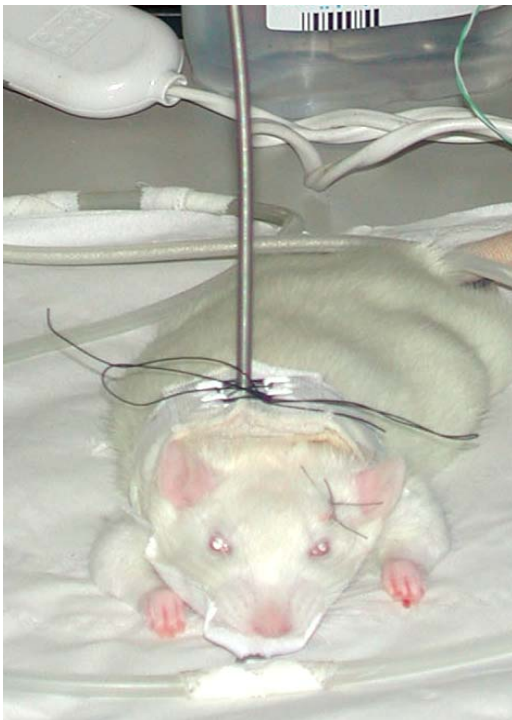


Abbildung 2.2

Versuchstier mit angelegtem „Infusionsjäckchen“ und der daran befestigten flexiblen Spiralanterie zur sicheren Ausleitung des Kabels der kranialen Temperatursonde.

Die transitorische fokale zerebrale Ischämie wurde durch eine von uns leicht modifizierte Methode der intraluminalen Gefäßokklusion nach Zea Longa et al. erzeugt (Zea Longa et al., 1989). Der wesentliche Unterschied zu der Methode nach Longa besteht in der Kanülierung der linken Arteria carotis communis zur Einbringung des monofilären 3-0 Nylonfadens, dessen Ende durch einen Silikonüberzug gleichmäßig verdickt worden war. Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Vergrößerung 3-bis 20-fach) wurde der linke laterale Halssitus über eine mediane Hautinzision dargestellt. Das Platysmaäquivalent, Musculus sternocleidomastoideus und die Vena jugularis externa wurden nach lateral gedrängt und mit einem selbstnachstellenden Retraktor gehalten. Der Musculus omohyoideus wurde in Richtung der Arteria carotis communis durchtrennt. Nun wurden die Arteria carotis communis, die Arteria carotis externa und die Arteria carotis interna dargestellt und unter Schonung der abgehenden Gefäße mobilisiert. Der Nervus vagus und die Vena jugularis interna wurden, um Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen zu vermeiden, unter äußerster Schonung von der Arteria carotis communis und der Arteria carotis interna abpräpariert und die Vena jugularis interna nach lateral und der Nervus vagus nach medial verlagert. Die Arteria carotis interna wurde bis zum Foramen jugulare dargestellt.

Um die Arteria cerebri media zu verschließen, wurde ein modifizierter chirurgischer monofilärer 3-0 Nylonfaden verwendet. Die Modifikation bestand in einer durch Hitze abgerundeten Spitze, einer Beschichtung mit Silikon mit konstantem Durchmesser und einer flexiblen Silikonspitze. Sinn der Modifikation war die Gefahr einer Endothelabrasion oder gar eine Ruptur des Gefäßes zu verhindern. In hier nicht gezeigten Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Gefahr einer nachträglichen Thrombosierung des Gefäßes durch eine Endothelabrasion minimal war (Sporer et al., 1997). Aus diesem Grunde verzichteten wir bei diesen Versuchen auf eine Kontrolle.

Über die Arteria carotis communis wurde der Okklusionsfaden in die Arteria carotis interna eingeführt und nun unter Sicht durchschnittlich 21mm von der Bifurkation der Arteria communis über das Foramen jugulare vorgeschoben, so dass sich der Kopf des Fadens am Abgang der Arteria cerebri media befand und diese verschloß. Dies erzeugte eine Minderdurchblutung im Mediastromgebiet.

Zur Beendigung der Ischämie nach drei Stunden wurde der Faden zurückgezogen und somit die Reperfusion eingeleitet. Trotz ligierter linker Arteria carotis communis war die Blutversorgung des Gehirnes in der Reperfusion über den Circulus arteriosus Willisii sichergestellt. Dieses konnte in Vorversuchen gezeigt werden und wurde deshalb hier nicht kontrolliert (Sporer et al.; 1997). In der Versuchsgruppe der sham-operierten Tiere wurde der Faden nur durchschnittlich 12mm bis kurz über die Schädelbasis vorgeschoben. Somit induzierte er keinen Verschluss der A. cerebri media und damit keine zerebrale Ischämie, da die Blutversorgung über den Circulus arteriosus sichergestellt war.

Abbildung 2.3

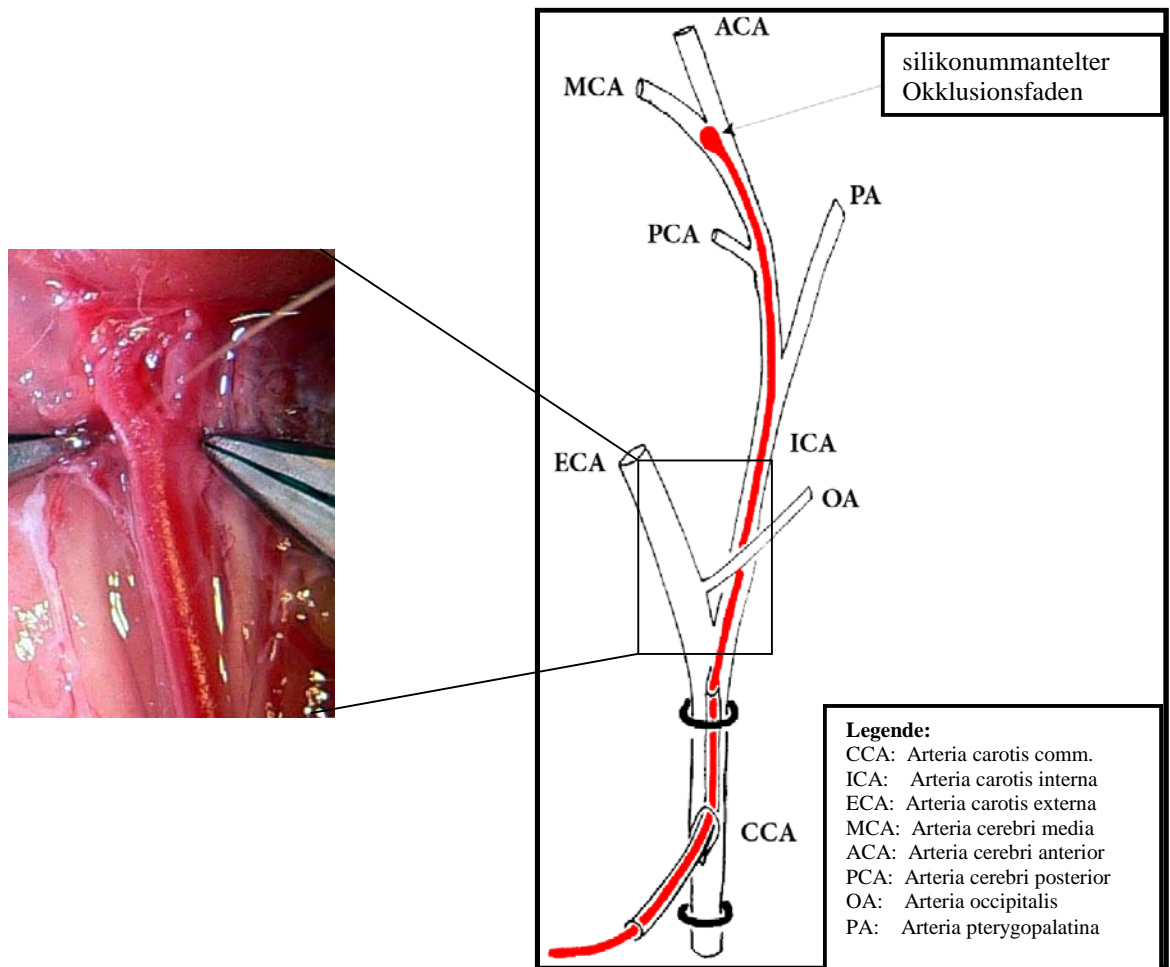


Abbildung 2.3

Rechts: Schematische Darstellung der Okklusion der Arteria cerebri media (MCA) mittels eines silikummantelten Okklusionsfadens. Der Faden wurde über die ligierte Arteria carotis communis (CCA) eingebracht und in der Arteria carotis interna (ICA) bis zum Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben. Der standardisierte silikummantelte Kopf des Fadens verschloss die Arteria cerebri media und führte zu einer Ischämie im Mediastromgebiet. Durch Zurückziehen des Fadens wurde die Reperfusion eingeleitet.

Links: Intraoperative Photographie mit Darstellung der freipräparierten Carotisbifurkation

Der systemische arterielle Blutdruck und der endexpiratorische Kohlendioxidgehalt wurden kontinuierlich während der gesamten Dauer des Eingriffes über ein PC-System mit dem Prozeßdatenerfassungssystem Perisoft (Perimed-Programm, Perimed, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet. Die Temperatur des Muskulus temporalis und die Umgebungstemperatur wurden zusätzlich über den gesamten 24-stündigen Versuchszeitraum durch das Prozeßerfassungssystem M 5360 (M 5360, Greisinger Electronics, Deutschland) aufgezeichnet.

Abbildung 2.4: Versuchsaufbau während der Ischämiephase

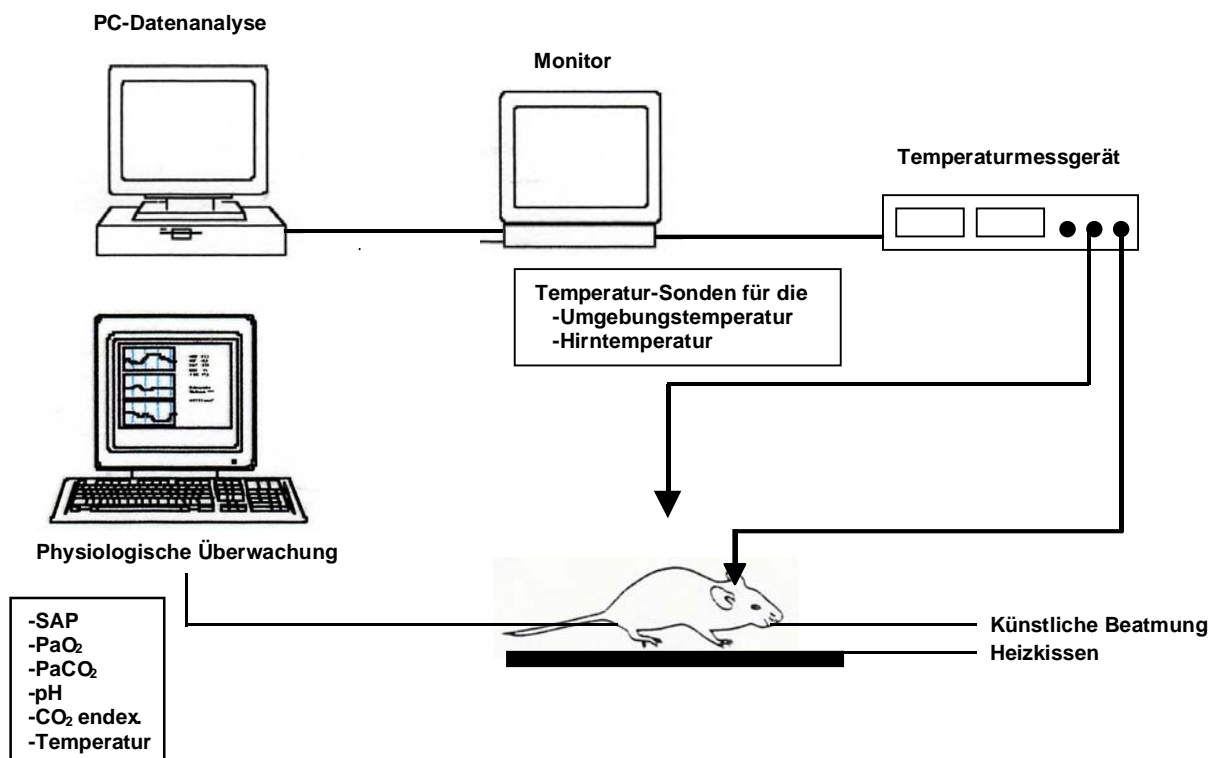


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau während der Ischämiephase

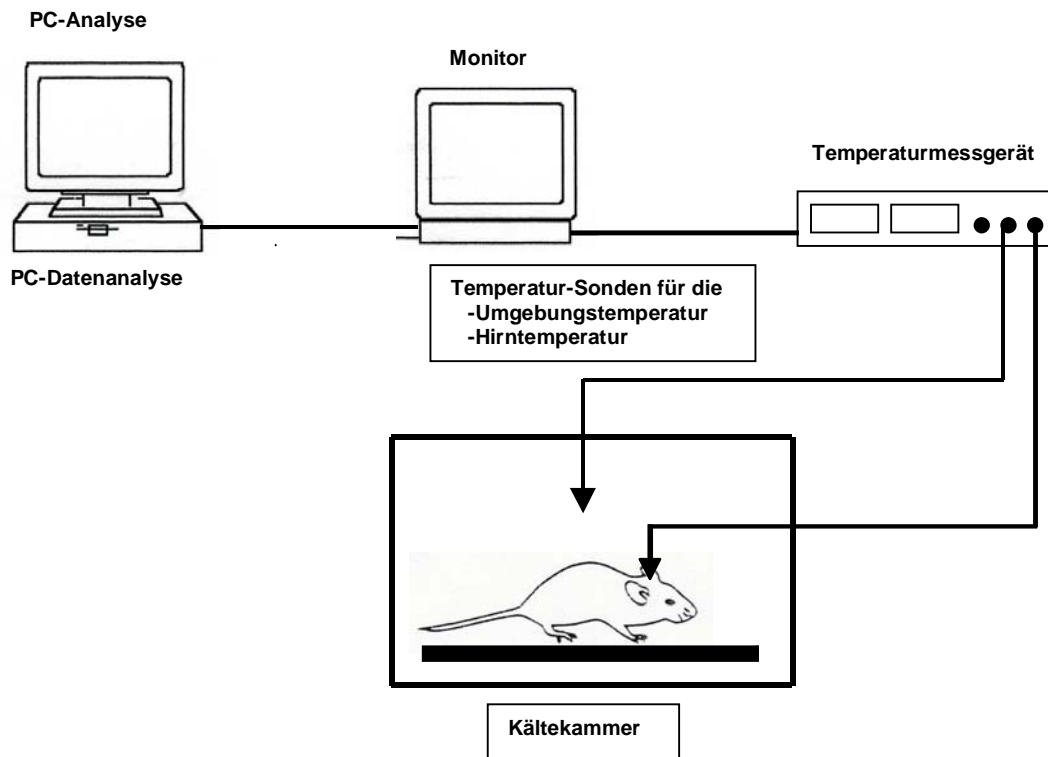
Anästhesierte Ratten wurden intubiert und anschließend künstlich beatmet. Im linken Musculus temporalis wurde eine Temperatursonde platziert und so die Temperatur während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Zusätzlich wurde der mittlere arterielle Blutdruck (SAP) und der endexpiratorische Kohlendioxidgehalt (CO₂ endex.) gemessen. In regelmäßigen Abständen wurden arterielle Blutproben zur Blutgasanalyse, zur pH- und Hämatokrit-Bestimmung gewonnen. Durch Vorschub eines Fadens über die Arteria carotis communis bis zum Abgang der Arteria cerebri media wurde eine dreistündige Ischämie im Mediastrombahngebiet erzeugt. Eine halbe Stunde vor Beendigung der Ischämie wurde mit der externen Kühlung begonnen, um die Hirn- und Körperkerntemperatur abzusenken. Danach wurde die Narkose beendet und die Tiere wurden nach dem Aufwachen in eine 4°C bis 8°C kalte Umgebung verbracht.

2.1.2.2. Versuchsdurchführung mit Beschreibung der Induktion der Hypothermie in der zweiten Versuchsphase (Reperfusion mit Hypothermie)

Zur Induktion der Hypothermie verwendeten wir die von uns leicht modifizierte Methode der extrakorporalen Kühlung von Yanamoto et al. (Yanamoto et al., 2001). Bei dieser Methode wird eine milde bis moderate Hypothermie (hier 31 bis 34°C) bei der Ratte durch eine reduzierte Umgebungstemperatur von 4 bis 8°C induziert. Unsere Modifikation dieser Methode bestand in der kontinuierlichen Messung und Aufzeichnung der Hirntemperatur bzw. der Temperatur des Muskulus temporalis und der Umgebungstemperatur mit Hilfe des Prozeßerfassungssystem M 5360 (M 5360, Greisinger Electronics, Deutschland). Eine halbe Stunde vor Beenden der Ischämie wurde durch externe Kühlung mit dem langsamen Absenken der Hirn- und Körperkerntemperatur begonnen. Ungefähr nach einer Stunde war die Zieltemperatur erreicht und die Narkose konnte ausgeleitet werden. Die Katheter der Arteria analis und der Vena jugularis externa wurden entfernt und die Hautwunden wurden mittels eines monofilären Fadens (Ethylon 4-0) verschlossen. Die Temperatursonde wurde zur kontinuierlichen Messung der Hirntemperatur belassen und dem Tier wurde das „Infusionsjäckchen“ mit der flexiblen Spiralantenne (small-rodent-jacket, Harward Apparatus, USA) übergezogen (siehe Abbildung 2.2). Das „Infusionsjäckchen“ hatte die Aufgabe zu verhindern, dass sich das Versuchstier von der Sonde befreite, da es während der 24-stündigen Reperfusionphase wach war und sich frei im Käfig bewegen konnte. So konnten Verletzungen des Tieres und ein Verlust der Sonde verhindert werden, der zu einem Ausschluß des Versuches geführt hätte. Während dieser Zeit hatte das Tier auch freien Zugang zu Nahrung und Wasser ad libidum. Nach Applikation des „Jäckchens“ wurde die Narkose ausgeleitet und die Tiere in einem Käfig in die 4 bis 8°C kalte Umgebung verbracht. Alle Versuchstiere tolerierten die erniedrigte Umgebungstemperatur sehr gut und zeigten bis auf ein gelegentliches Kältezittern, keine Zeichen von Beeinträchtigung während dieser Phase. Sowohl die Hirntemperatur wie auch die Umgebungstemperatur wurden über 24 Stunden kontinuierlich gemessen und mittels des Prozeßerfassungssystems M 5360 (M 5360, Greisinger Electronics, Deutschland) aufgezeichnet. Danach wurde der Versuch beendet. Die Tiere wurden mittels einer Intubationsnarkose (oben beschrieben) anästhesiert und die Temperatursonde wurde aus dem Muskulus temporalis entfernt. Zur Fixierung und Entnahme des Gehirns für die histologische und biochemische Aufarbeitung mußte das Gehirn blutleer sein. Deshalb wurde über einen medianen thorakalen Hautschnitt eine Thorakotomie durchgeführt, das Perikard eröffnet und die großen herznahen Gefäße wie Vena cava superior et inferior und die Aorta ascendens dargestellt. Über den linken Ventrikel des Herzens wurde ein Katheter, hergestellt aus einem gewöhnlichen Perfusorverlängerungsschlauch mit abgerundeter Spitze, in die Aorta ascendens

eingbracht und mittels einer Ligatur gesichert. Danach wurde die Aorta abdominalis mittels einer Arterienklemme nach Mikulicz abgeklemmt und der rechte Vorhof des Herzens mittels spitzer Schere eröffnet. Über einen Perfusor (Precidor, Basel, Schweiz) wurden 200ml der unten beschriebenen gekühlten Perfusionsspüllösung (siehe Kapitel 2.3.1) infundiert und so die oberen Extremitäten, Hals, Kopf und das Gehirn von intravasalem Blut befreit. Die Perfusionsspüllösung diente zum Durchspülen und Reinigen der Hirngefäße von korpuskulären und nichtkorpuskulären Blutbestandteilen insbesondere der untersuchten Proteine (z.B. Kollagen IV) und Proteasen (MMP-2 und MMP-9, u-PA und t-PA), welche zu einer Verfälschung der Messergebnisse geführt hätten. Diese Spüllösung bestand aus 200 ml phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (1,48g/l Na_2HPO_4 ; 0,43g/l KH_2PO_4 ; 7,20g/l NaCl) mit 1% Rinderalbumin (BSA), 200 μg Natriumnitroprussid und 100 internationalen Einheiten Heparin (alle Chemikalien Sigma Chemicals, Deutschland).

Über einen sagittalen kranialen Hautschnitt wurde die Schädelkalotte mittels eines Luers eröffnet und die beiden Ossa parietales und das Os frontale entfernt. Danach erfolgte die Eröffnung der Dura mater und die Entfernung des Gehirnes. Um eine Ruptur der intrakraniellen Gefäße insbesondere der A. carotis interna und der A. cerebri media durch den Vorschub des Okklusionsfadens auszuschließen, wurde die Schädelbasis auf Blutclots inspiziert. Eine Verletzung der intrakraniellen Gefäße hätte zum Ausschluß des Versuchstieres geführt. Dies kam jedoch kein einziges Mal vor. Das Gehirn wurde vom Kleinhirn befreit und erst mittels einer -20°C und dann mittels einer -80°C kalten Isopentanolösung für jeweils fünf Minuten kryofixiert. Danach wurden die Gehirne bis zur histologischen und biochemischen Aufarbeitung im Gefrierschank bei -80°C gelagert.

Abbildung 2.5: Versuchsaufbau während der Reperfusionphase**Abbildung 2.5: Versuchsaufbau während der Reperfusionphase**

Während der 24-stündigen Reperfusionphase wurden die Tiere in eine 4 bis 8°C kalte Umgebung verbracht und durch externe Kühlung eine milde bis moderate Hypothermie des Hirnes erzeugt. Die Hirntemperatur bzw. die Temperatur des Muskulus temporalis wurde kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

2.1.2.3. Meßeinrichtungen und Meßverfahren

Die Überwachung der Beatmungsparameter erfolgte über die Entnahme von arteriellen Blutproben aus dem Katheter der Arteria femoralis und deren Analyse von Sauerstoffpartialdruck (PO₂), Wasserstoffionenkonzentration (pH), Kohlendioxidpartialdruck (PCO₂) und des Base-excess (BE) mit einem Blutgasanalysator der Marke Instrumentation Laboratory IL 1306 (Instrumentation Laboratory, Illinois, USA).

Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde kontinuierlich gemessen und durch ein Heizkissen durch ein automatisches Regelungsgerät (Greisinger Electronics, Regensburg, Deutschland) auf 37,0 Grad Celsius gehalten.

Die Hirntemperatur bzw. die Temperatur im Muskulus temporalis wurde mit Hilfe einer Temperatursonde im linken Muskulus temporalis kontinuierlich gemessen und mit Hilfe

des computergestützten Prozeßerfassungssystems M 5360 (M 5360, Greisinger Electronics, Deutschland) aufgezeichnet. Zusätzlich wurde mit diesem System die Umgebungstemperatur kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

Der systemische arterielle Blutdruck wurde mittels des Katheters in der Arteria analis kontinuierlich über einen Druckwandler (Statham P23, Viggo-Spectramed, Oxnard, CA, USA) registriert und mit dem Prozeßdatenerfassungssystem Perisoft (Perimed-Programm, Perimed, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet.

2.1.3. Versuchsprotokolle der Tierversuche

Die nachfolgenden Versuchsreihen wurden durchgeführt:

- Gruppe 1: Hypothermiegruppe (n= 6):
3h Ischämie mit 24h Reperfusion und 24h Hypothermie
- Gruppe 2: Normothermiegruppe (n= 6):
3h Ischämie mit 24h Reperfusion und 24h Normothermie;
- Gruppe 3: Kontrollgruppe sham-operiert (n= 6):
keine Ischämie mit 24h „Reperfusion“ und 24h Normothermie;

2.2. Aufarbeitung der gewonnenen Hirnpräparate

2.2.1. Aufarbeitung der Hirne

Die gewonnenen Hirne wurden, nachdem sie 24 Stunden bei -80°C tiefgefroren waren, weiterverarbeitet. Es wurden mit einem auf -18°C gekühlten Kryo-Staten 10µm dicke Schnitte des gesamten Hirnes hergestellt. Mit Ausnahme der Region Bregma +1mm bis Bregma +2mm wurde jeder fünfzigste Schnitt asserviert und für immunohistochemische Färbungen für die Bestimmung der Infarkt volumina verwendet. Der Rest wurde verworfen. In der Region Bregma +1mm bis Bregma +2mm wurde jeder Schnitt, insgesamt 100 Stück, asserviert für spätere immunohistochemische Färbungen oder biochemische Untersuchungen wie z.B. Western Blots oder Zymographien. Die Methode der Aufarbeitung hatte drei große Vorteile. Erstens ist sie sehr materialschonend d.h. es konnte die Versuchstierzahl gering gehalten werden. Zweitens brauchten wir von den 100 Schnitten für diese Untersuchungen nur etwa die Hälfte der Schnitte und somit steht für weitere Untersuchungen noch Material zur Verfügung, wenn neue interessante Fragestellungen auftauchen sollten. Und drittens können durch die räumliche Nähe der Schnitte sehr exakte Aussagen z. B. über die Lokalisation von Proteasen gemacht werden.

Alle Schnitte wurden nach dem Schneiden bis zur endgültigen Aufarbeitung bei -80°C asserviert.

2.2.2. Die immunohistologische Färbung gegen das Protein Mikrotubulin-assoziiertes-Protein-2 (MAP-2)

Um den zerebralen Infarkt und die Infarktgröße darzustellen und nachzuweisen wurde jeder fünfzigste Hirnschnitt beginnend am Frontpol des Hirnes bis zum Okkzipitalpol immunohistochemisch gefärbt und danach ausgewertet (siehe unten). Als immunohistochemische Färbung wurde die Mikrotubulin-assoziiertes-Protein-2-Färbung (MAP-2-Färbung) verwendet (siehe Abbildung 2.6).

Die MAP-2-Färbung wurde nach dem Protokoll von Pfefferkorn et al. durchgeführt (Pfefferkorn et al.; 2000).

Die Schnitte wurden auf Raumtemperatur erwärmt, luftgetrocknet und mit einem 1:1 Aceton/Chloroform-Gemisch fixiert. Danach erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Proteasen zur Reduzierung einer unspezifischen Färbung mit Blotto (siehe unten) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Blockierung erfolgte mehrmaliges Waschen in PBS-Spüllösung. Danach erfolgte der Inkubationsschritt mit dem primären Antikörper. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Maus-anti-Ratte MAP-2-Antikörper (Boehringer Mannheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1:800 verwendet. Der Antikörper war in einer Lösung aus 50 mM Tris-HCL, 9 g/l NaCl, 0,4 g/l bovinem Serumalbumin und 0,5 g/l Thimerosal (alle Chemikalien Sigma Chemicals, Deutschland) gelöst. Die Schnitte wurden erst für zwei Stunden bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C mit dem MAP-2 Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wieder in PBS gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper von den Schnitten zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es wurde als Sekundärantikörper ein biotinierter Ziege-gegen-Maus-IgG-Antikörper (goat-anti-mouse-IgG: Vector, Burlingame, CA, USA) für die Ratte in einer Konzentration von 1:200 benutzt. Nach dieser Inkubation erfolgte abermals ein Waschvorgang mit PBS und danach eine Inkubation mit ABC-Agent (Vector, Burlingame, CA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem anschließenden Waschgang in PBS.

Um die Färbung sichtbar zu machen, erfolgte letztendlich eine Inkubation mit Diaminobenzidin mit der Konzentration 0,5 g/l in PBS mit 0,01% Wasserstoffperoxid für 5 Minuten bei Raumtemperatur (DAB; 0,5 g/l in PBS; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) mit anschließendem Waschgang in PBS.

Danach wurden die Schnitte für die Auswertung in Kaiser`s Gelatine eingebettet.

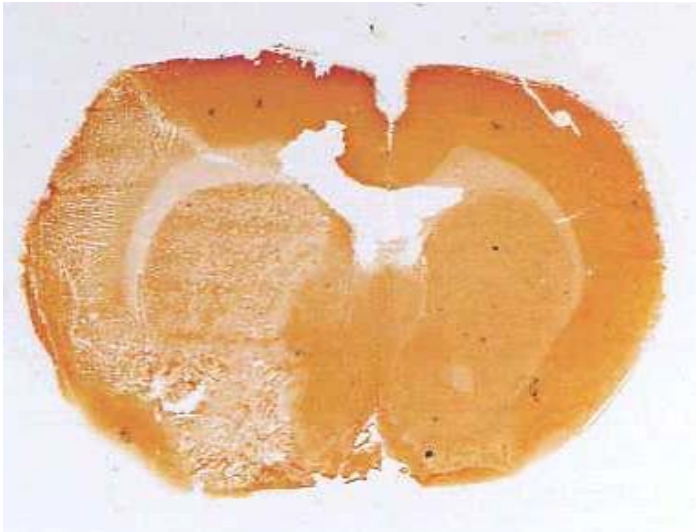
Abbildung 2.6

Abbildung 2.6 Exemplarischer Hirnschnitt aus dem ischämischen Bereich Bregma +2,5 mm. Der Schnitt wurde immunohistochemisch mit der MAP-Färbung gefärbt. Nichtischämisches Hirngewebe stellt sich rötlich dar und ischämisches Hirngewebe zeigt eine minimal rötliche bis weißliche Färbung.

2.2.3. Die Infarktgrößenbestimmung (Volumetrie)

Um die Infarktgröße zu bestimmen, verwendeten wir die in unserer Arbeitsgruppe gebräuchliche Methode nach Kloss et al. (Kloss et al., 2002).

Zuerst wurden alle Schnitte, die in die Infarktgrößenbestimmung einbezogen werden sollten, d.h. jeder fünfzigste Schnitt beginnend vom Frontal- bis zum Okkizitalpol wie oben beschrieben, immunohistochemisch mit der MAP-2-Färbung gefärbt und in Kaiser's Gelatine eingebettet.

Mit dem Flachbrettscanner Epson Perfection 1240U (Seiko Epson, Nagano, Japan) wurden alle Hirnschnitte gescannt und digitalisiert. Die Dateien der Scans wurden in das Bildverarbeitungs- und Auswertungssystem Optimas 6.2 Imaging Software importiert, die Infarktareale manuell detektiert, eingezeichnet und in das metrische System konvertiert (siehe Abbildung 2.7).

Danach wurde das Partialvolumen zwischen zwei benachbarten Schnitten bzw. Infarktarealen (Arealen) näherungsweise mit der Formel für eine konische Sektion berechnet:

$$\text{Partialvolumen} = \frac{\text{Areal}_{i-1} + \text{Areal}_i + \sqrt{\text{Areal}_{i-1} \times \text{Areal}_{i-1,i}}}{3} \times (\text{A. zw. Sch.})_{i-1,i}$$

(A. zw. Sch.) = Abstand zwischen den Schnitten

Areal = Infarktareal

Die Abschnitte Areal_{1,2,3,...,n-1} sind Schnitte mit Infarktarealen, wobei Areal₀ und Areal_n der erste und der letzte Schnitt ohne Infarktareal sind. Um das Gesamtfarktvolumen eines Versuchstieres zu bestimmen, wurden alle Partialvolumina mit folgender Formel addiert:

$$\text{Totales Infarktvolumen} = \sum_{i=1}^n (\text{Partialvolumen})_i$$

Abbildung 2.7

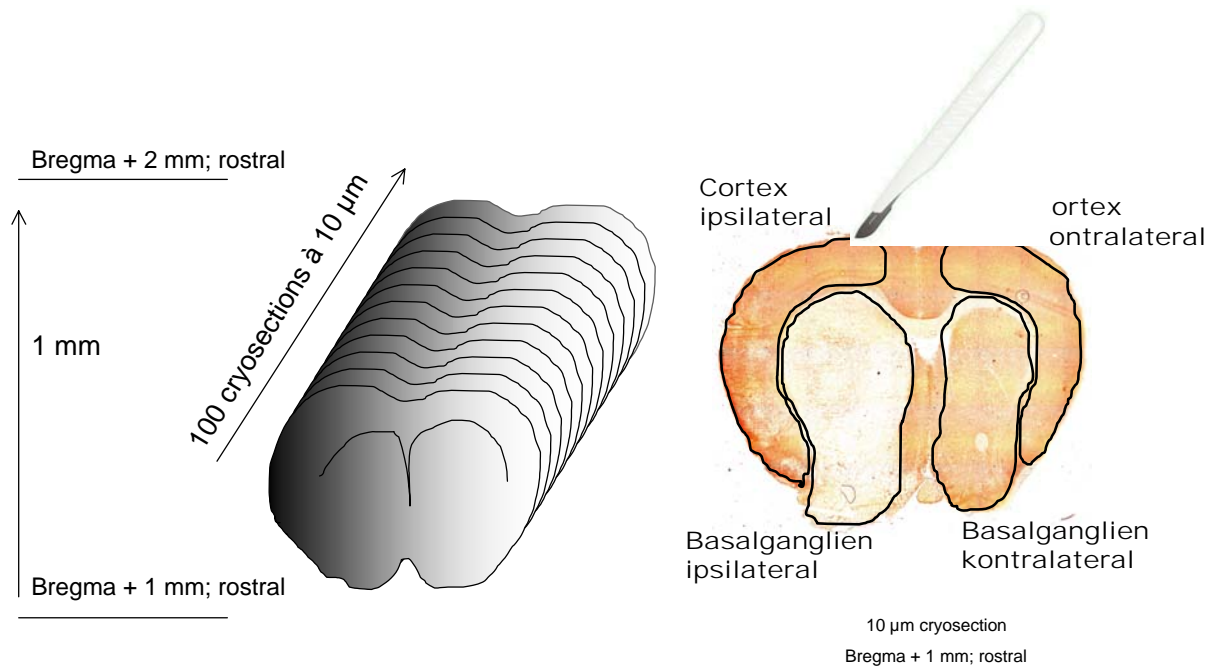


Abbildung 2.7

Linke Abbildung: Graphische Darstellung der Hirnschnitte des ischämischen Bereiches Bregma +1mm bis Bregma +2mm eines geschnittenen Rattenhirnes.

Rechte Abbildung: Exemplarischer Hirnschnitt mit den eingezeichneten Arealen in Cortex und Basalganglien zur volumetrischen Auswertung durch das Optimasssystem 6.2. Zur Infarkt volumenbestimmung wurde jeder 50-zigste Hirnschnitt des gesamten Hirnes ausgewertet und berechnet. Für die immunohistochemischen und biochemischen Analysen wurden jedoch nur Schnitte des dargestellten Bereiches Bregma +1mm bis Bregma +2mm herangezogen.

2.2.4. Biochemische Aufarbeitung

2.2.4.1. Die Proteinisolierung

Für die biochemische Aufarbeitung der Hirnschnitte für Western Blots und Zymographien mußten zuerst die entsprechenden Proteine der Hirnschnitte isoliert werden.

Dafür verwendeten wir die Methode von Burggraf et al. (Burggraf et al., 2003).

Hirnareale von gleicher Größe von der ischämischen und nichtischämischen Hemisphäre aus Cortex und Basalganglien wurden von den 10 µm dicken Hirnschnitten exzidiert (siehe Abbildung 2.7 rechts).

Für die nachfolgenden Western Blot Analysen wurde das Hirnmaterial in einer Lysis-Lösung aus 20 mM Tris (pH 7,3), 1 mM EDTA, 2% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) (Ultraschallbad für 10 s) gelöst und für 10 min bei 13 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert.

Für die nachfolgenden Zymographie-Analyse wurde das Hirnmaterial in einer Homogenisierungslösung aus 5 mM Tris (pH 7,5) und 75 mM NaCl homogenisiert. Beide Lysate bzw Homogenisate wurden danach mit dem Proteaseinhibitor Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Flourid (PMSF) (100 µg/ml), Aprotinin (10 µg/ml) und Leupeptin (10 µg/ml) behandelt um die Proteindegradation zu verhindern. Routinemäßig wurde die Proteinkonzentration mit einem modifizierten Bradford-Protein-Assay mit BSA als Standard (TEBU GmbH, Deutschland) bestimmt. Alle Arbeitsschritte für die Aufarbeitung des Hirngewebes wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.2.4.2. Western Blot für Kollagen IV und Hämoglobin

Für die Western Blots für Kollagen IV und Hämoglobin verwendeten wir die Methode von Burggraf et al. und Hamann et al. (Burggraf et al., 2003; Hamann et al., 2002).

Die verwendete Methode ist für den Kollagen IV Western Blot und den Hämoglobin Western Blot gleich. Wo sich Abweichungen ergeben, werden diese ausdrücklich erwähnt.

Die Proteine Kollagen IV und Hämoglobin wurden mit einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-(SDS)-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Gleiche Mengen des entsprechenden Proteins wurden zweimal in einem Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-(SDS)-Elektrophorese-Gel verdünnt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und auf ein 7,5 % Polyacrylamid-Gel beschickt und dieses für 2 Stunden bei einer Spannung von 100 Volt laufen gelassen. Die Proteine wurden danach bei 4 °C für eine Stunde bei 400 mA in einer Transfer-Pufferlösung, die aus 10 mmol/l 3-(Cyclohexyl-Amino)-1-Propan-Sulfonsäure (pH 11,0) mit 10 % Methanol bestand, auf eine Polyvinyl-Difluorid-Membran (Sequi-Blot; Biorad, München, Deutschland) transferriert. Nach der Immobilisation wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt, um die gleiche Beladung und den Transfer der Proteine aller Proben sicherzustellen. Danach wurden die Blots bei Raumtemperatur für eine Stunde in 3 % BSA in Tris-gepufferter NaCl-Lösung mit 0,2 % Tween 20 blockiert. Dann erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation der Blots für die Kollagen IV Western Blots mit einem Ziege-Antikollagen-Typ-IV-Antikörper (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) in einer Verdünnung von 1:500 in einer Blockierlösung aus 3 % BSA mit Tween 20. Für den Hämoglobin Western Blot wurde ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Hämoglobin-Antikörper (DPC Biermann, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Nach dreimaligen zehnmütigen Waschen in Tris-gepufferter NaCl-Lösung wurden die Blots für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten Anti-Ziege-Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in Tween 20 inkubiert. Für den Hämoglobin Western Blot wurde ein biotinylierter Anti-Kaninchen- Antikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet. Danach wurde das Vectastain

ABC Reagenz (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach dreimaligem zehnmütigem Waschen mit Tween 20 wurde der Western Blot mit einem ECL Entwicklungskit (Amersham, Beckinghamshire, UK) entwickelt und beendet.

2.2.4.3. Gelatinezymographie für Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und -9

Mit dieser Gelatinezymographie wurden die Enzymaktivitäten der Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und MMP-9 bestimmt.

Gleiche Mengen des isolierten Proteins des Hirngewebes (siehe oben) für die nicht-reduzierende Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-(SDS)-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurden über ein β -mercaptoäthanolreies 10% Polyacrylamidgel mit 0,5% Gelatine laufen gelassen (Biorad, Deutschland). Nach einer Renaturierung der Enzyme mit 2,5% Triton X-100 (für 1 h bei Raumtemperatur) wurde die enzymatische Verdauung im Gel mit einer Inkubationspufferlösung aus 5 mM CaCl_2 , 50 mM Tris/HCL (pH 7,4), 200 mM NaCl und 0,2% Brij 35 für 24 h bei 37 °C fortgesetzt.

Um die enzymatische Verdauung sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Brilliant-Blau-R (Protokoll siehe unten) gefärbt. Die Lysezonen, als farblose klare Zonen in den Gelen, zeigen die enzymatische Verdauung. Um das molekulare Gewicht zu kalibrieren d.h. um die Proteine zu standardisieren, wurde erstens ein molekularer käuflicher Standard (Biorad, Deutschland) und zweitens ein käuflicher rekombinater humaner MMP-2 und MMP-9-Standard (Sigma, Deutschland) verwendet.

Die Auswertung der Gele erfolgte wie unter Kapitel 2.2.4.6 beschrieben.

2.2.4.4. Kasein-abhängige-Plasminogen-Zymographie für die Plasminogen-aktivatoren t-PA und μ -PA

Mit der Kasein-abhängigen-Plasminogen-Zymographie wurden die Enzymaktivitäten der endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA bestimmt.

Für die Gel-Zymographie verwendeten wir das Protokoll von Heussen und Dowdle (Heussen et Dowdle, 1980). Dafür wurden die Polyacrylamid-SDS-Gele mit Kasein (5mg/mL; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Plasminogen (0,01 U/mL, hier 0,07 μ g/mL; Sigma) kopolymerisiert.

Für die Kasein-abhängige-Plasminogen-Zymographie wurde das Hirnmaterial von Cortex und Basalganglien von drei 10 μ m-Hirnschnitten mit einem Skalpell abgekratzt und separat in 15 μ l Homogenisationspuffer aus 0,1 M Tris/HCl (pH 8,1) und 0,2% Triton X-100 (gelöst in H₂O) im Ultraschallbad gelöst und für 15 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. Danach wurde der Auftragspuffer aus 5% SDS, 2% Glycerin und Bromphenolblau (gelöst in

Wasser) hergestellt und mit den zu untersuchenden Proben vermischt. Dann wurde die Gelelektrophorese der 7,5% SDS-PAGE (83,3 μ l Plasminogen, 75 mg Casein auf 15ml Wasser) durchgeführt. Danach erfolgten ein Waschschrift bei Raumtemperatur in 2% Triton für eine Stunde und ein kurzer Waschgang in Wasser. Über Nacht standen die Gele in 0,1 M Tris/HCl-Lösung (pH 8,1) bei 37 °C. Für die Detektion und Auswertung wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Die Auswertung der gefärbten Gele erfolgte wie unter Kapitel 2.2.4.6 beschrieben.

(Alle Chemikalien von Sigma, Deutschland)

2.2.4.5. Die Coomassie-Färbung

Nach durchgeführter Elektrophorese erfolgte eine standardmäßige Coomassiefärbung zur besseren Detektion und Auswertung der Gele.

Zuerst wurde ein Fixationsschritt der Gele in 10% CH₃COOH und 50% MeOH für eine halbe Stunde durchgeführt. Danach erfolgte die Färbung für eineinhalb Stunden mit 0,4% Brilliant Blau R, 35% EtOH und 10% CH₃COOH. Zuletzt wurde die Entfärbungsphase mit 35% EtOH und 10% CH₃COOH durchgeführt.

(Alle Chemikalien von Sigma, Deutschland)

2.2.4.6. Auswertung der Zymographien und Blottings

Die Gele der Western Blots und der Zymographien wurden wie oben beschrieben zur besseren Detektion und Auswertung mit Coomassie gefärbt. Die einzelnen Banden der gefärbten Gele wurden mit einem Flachbrettscanner (Epson Perfection 1240U) eingescannt und digitalisiert. Die einzelnen Banden wurden mit dem optischen Analyseprogramm TINA (TINA, Version 2.08, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Deutschland) densometrisch ausgewertet. Die Densometrieresultate wurden auf einer willkürlich gewählten optischen Dichteskala angesiedelt. Die Daten wurden als relative Lysezonen (pixel) pro μ g Protein und mm Banden-Breite dargestellt und zeigen das Verhältnis der Daten zwischen ischämischer und nichtischämischer Hemisphäre.

2.3. Eingesetzte Substanzen (soweit nicht schon im Text beschrieben)

2.3.1. Die Perfusionslösung

Die Perfusionsspüllösung diente zum Durchspülen und Reinigen der Hirngefäße von korpuskulären und nichtkorpuskulären Blutbestandteilen insbesondere der untersuchten Proteine (z.B. Kollagen IV) und Proteasen (MMP-2 und MMP-9, u-PA und t-PA), welche zu einer Verfälschung der Messergebnisse geführt hätten. Die Spüllösung bestand aus 200 ml phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (1,48g/l Na_2HPO_4 ; 0,43g/l KH_2PO_4 ; 7,20g/l NaCl) mit 1% Rinderalbumin (BSA), 200 μg Natriumnitroprussid und 100 I.E. (internationale Einheiten) Heparin (alle Chemikalien Sigma Chemicals, Deutschland)

2.3.2. Blotto

Die Blotto-Lösung zur Blockierung unspezifischer Proteasen wurde hergestellt aus 50mM Tris-HCL, 9 g/l NaCl, 50 g/l nicht fetthaltiges Milchpulver, 10 ml/l Horse Serum und 0,2 g/l Sodiumazid (alle Chemikalien Sigma Chemicals, Deutschland).

2.4. Statistische Methoden

Die Daten werden als Mittelwert (Mean) \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

Alle Analysen wurden als Verhältnis zwischen der ischämischen und der nichtischämischen Hemisphäre dargestellt.

Um Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen aufzuzeigen, wurde ein Mann-Whitney *U* Test durchgeführt. Dabei wurde Signifikanzlevel von 5% d.h. ein *P*-Wert von $P < 0,05$ als signifikant angesetzt.

Die Analyse der MMP-2-, MMP-9-, u-PA- und t-PA-Werte wurden einer ANOVA-Analyse (Kruskal-Wallis-Analyse) unterzogen.

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Parameter

Wie im Kapitel 2 ausführlich beschrieben, gliederte sich der gesamte Versuch in zwei Phasen. Die erste Phase bestand aus der 3-stündigen Ischämie mit Induktion der Hypothermie. Phase 2 beinhaltet die 24-stündige Reperfusion mit postischämischer Hypothermie.

Während der gesamten Dauer der ersten Versuchsphase wurde kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Körperkerntemperatur (T) kontrolliert und aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Temperatur des Hirnes bzw. die Temperatur im linken Muskulus temporalis in der ischämischen Hemisphäre und die Umgebungstemperatur kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (Werte siehe unten). In Intervallen erfolgte die Kontrolle und Aufzeichnung des Sauerstoffpartialdruckes (PO_2), des Kohlendioxidpartialdruckes (PCO_2), der Wasserstoffionenkonzentration (pH) und des Hämatokrits (Hkt). Sämtliche Meßwerte mit Ausnahme der Hirntemperatur in der Versuchsgruppe mit Hypothermie (Versuchsgruppe 1: 3h Ischämie und 24h Reperfusion mit 24h Hypothermie) lagen im physiologischen Normbereich (Werte hier nicht gezeigt).

In der zweiten Versuchsphase in der Reperfusion nach Erwachen der Tiere aus der Narkose wurde nur noch die Temperatur des Hirnes bzw. die Temperatur im Muskulus temporalis und die Umgebungstemperatur kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (Werte siehe unten). Die Umgebungstemperatur betrug in der ersten Phase des Versuches vor Induktion der Hypothermie im Mittel $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ und in der Phase der Hypothermie $5^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ (Werte hier nicht gezeigt).

3.2. Der Verlauf der Hirntemperatur bei Normo- und Hypothermie

Der Temperaturverlauf der Hirntemperatur der Versuchstiere ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Dabei wurden über den gesamten Versuchsverlauf die Hirntemperatur und die Umgebungstemperatur kontinuierlich aufgezeichnet. Die Messungen begannen nach zwei Stunden Ischämie mit dem kontinuierlichen Herunterkühlen der Versuchstiere von 37°C auf eine milde bis moderate Hypothermie von 31-34°C, die über die gesamte Reperfusion gehalten wurde (Versuchsgruppe 1). Bei der Versuchsgruppe der normothermen Tiere wurde die Hirn- und Körperkerntemperatur auf 37°C gehalten (Versuchsgruppe 2 und 3). Die Werte für die Umgebungstemperatur wurden nicht dargestellt.

Abbildung 3.1

Der Verlauf der Hirntemperatur bei Normo- und Hypothermie

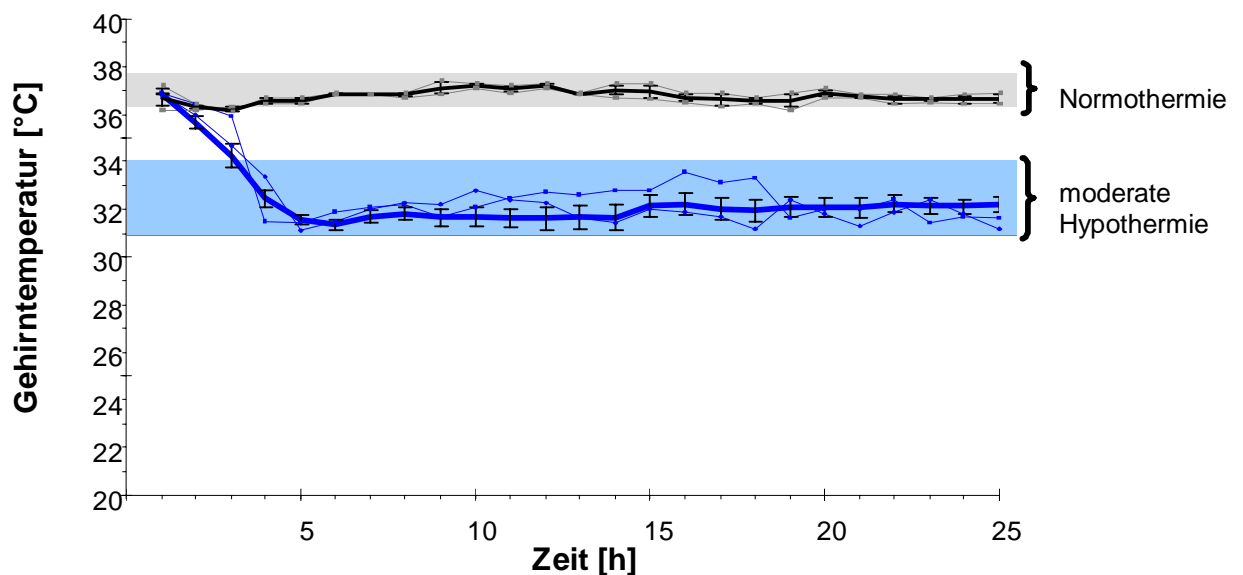


Abbildung 3.1: Es ist der mittlere Verlauf der Hirntemperatur der Tiere aus der Normo- und Hypothermie-Gruppe während der kompletten Hypothermiephase (24 Stunden) dargestellt. Zusätzlich wurden exemplarisch von jeder Gruppe Temperaturverläufe von je 2 Tieren aufgetragen.

3.3. Einfluss der Hypothermie auf das Infarktvolumen

Eine 24-stündige milde bis moderate zerebrale Hypothermie in der Reperfusionphase reduzierte signifikant das Infarktvolumen um 21 %. Dabei sank das Infarktvolumen von $191,9\text{mm}^3 \pm 43\text{mm}^3$ SEM (Normothermiegruppe) auf $152,5\text{mm}^3 \pm 42\text{mm}^3$ SEM in der Hypothermiegruppe (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2).

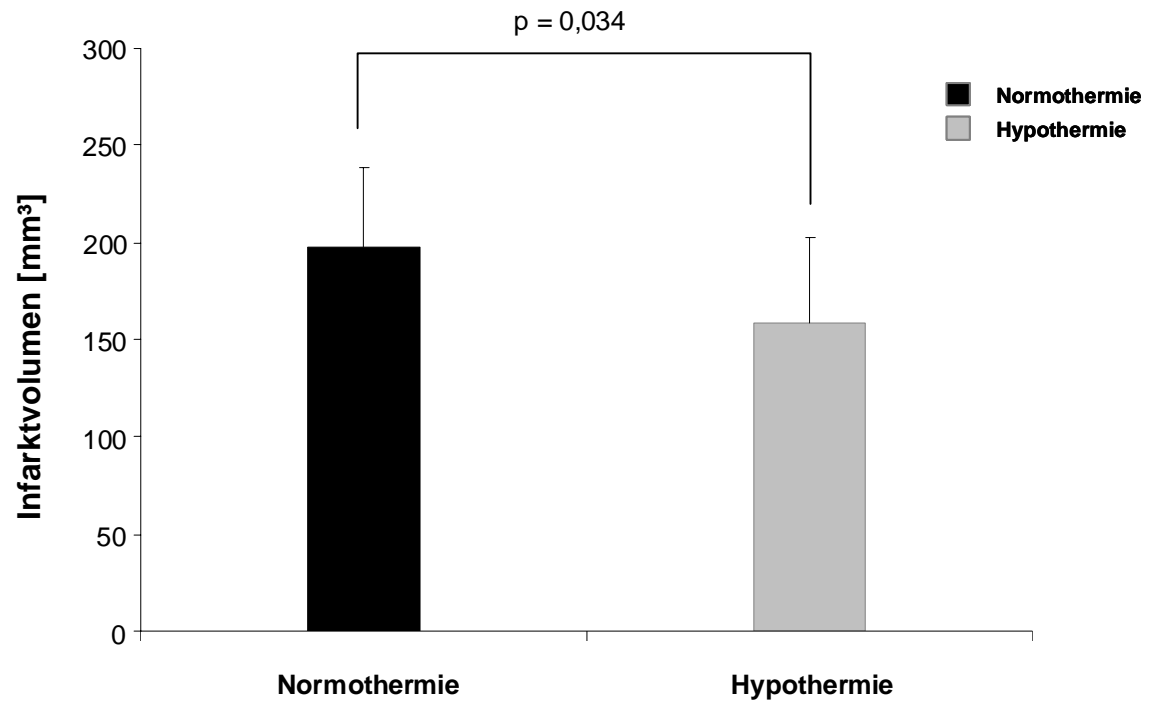
Tabelle 3.1

	Infarktvolumen [mm^3]	t-test: p =
Normothermie	$191,9 \pm 43$	0,034
Hypothermie	$152,5 \pm 42$	

Tabelle 3.1: Infarktvolumina der Hirne der Versuchsgruppe mit Normo- und Hypothermie. Dabei reduzierte die Hypothermiebehandlung das Infarktvolumen signifikant ($p < 0,05$; Student t-Test). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

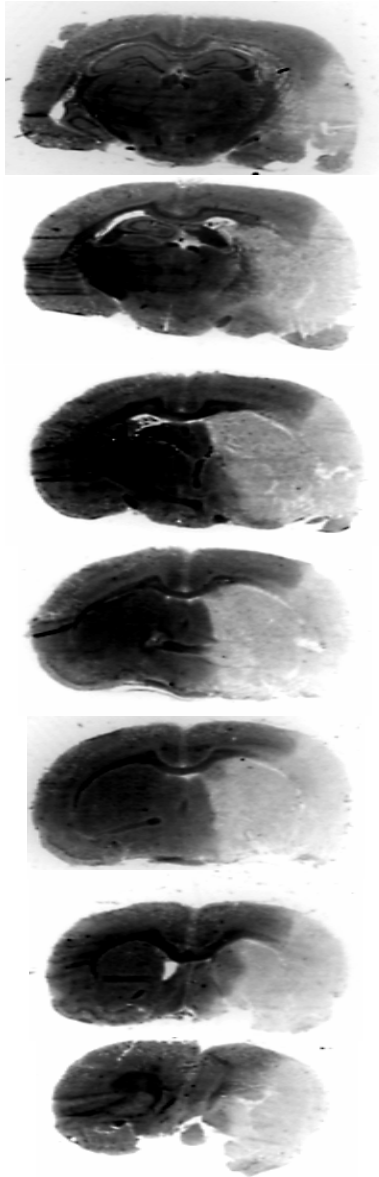
Abbildung 3.2. A und B

3.2. A

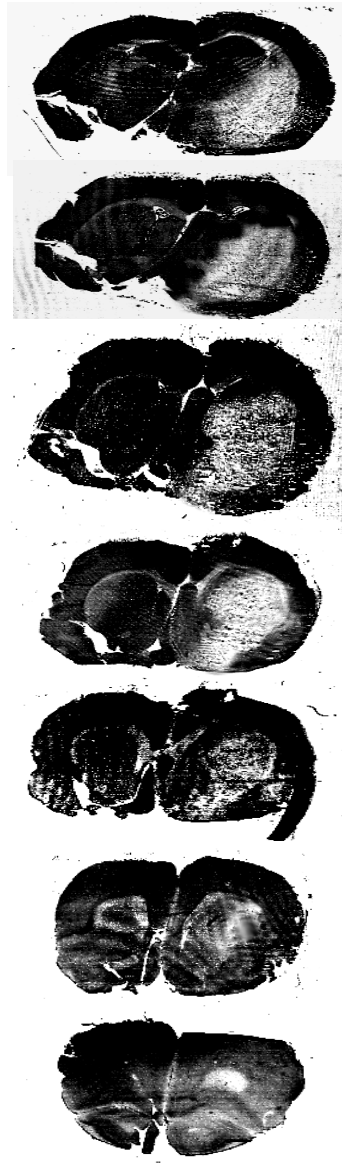


3.2. B

Normothermie



Hypothermie

**Abbildung 3.2. A und B:**

(A): Infarkt volumina der Tiergruppen mit Ischämie/Reperfusion unter normothermen und hypothermen Bedingungen. Es wurde der Mittelwert \pm Standardfehler aus jeweils 6 Tieren berechnet.

(B): repräsentative MAP-2 gefärbte Gehirnschnitte im Abstand von jeweils 1 mm jeweils von einem Tier mit normothermer und hypothermer Behandlung während der Reperusionsphase. Die entfärbten Bereiche (graue Zonen) entsprechen dabei den ischämischen Arealen.

3.4. Schutz der Basalmembran durch Hypothermie

Kollagen Typ IV ist Hauptbestandteil der extrazellulären Basalmembran. Deshalb gibt eine Analyse des Kollagen IV Auskunft über das Ausmaß der Schädigung der Basalmembran. Um den Einfluß von Blutbestandteilen (z.B. intravasales Kollagen) bei dieser Bestimmung auszuschließen wurden die Hirne, wie in Kapitel 2 beschrieben, am Ende des Versuches intensiv gespült, um alle Gefäße von Blut zu reinigen.

Mit Hilfe eines Western Blots konnte Kollagen IV semi-quantitativ bestimmt und in den verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden. Die Western Blots zeigten einen signifikanten Verlust von Kollagen Typ IV der zerebralen Gefäße durch den Ischämie-Reperfusionsschaden.

Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an Kollagen Typ IV im ischämischen Kortex $64 \pm 4\%$ der nichtischämischen kontralateralen Seite betrug. In den Basalganglien war der Verlust von Kollagen Typ IV noch stärker: $43 \pm 4\%$, (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.3. A, B, C und D)

Dieser Verlust an Kollagen Typ IV war in der Hypothermiegruppe signifikant vermindert. Kollagen Typ IV war im Kortex nur auf $74 \pm 16\%$ und in den Basalganglien sogar nur auf $87 \pm 16\%$ reduziert (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.3. A, B, C und D).

Bei der scheinoperierten Kontrollgruppe zeigte sich, wie zu erwarten, kein Unterschied im Gehalt von Kollagen Typ IV zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite des Kortex und der Basalganglien (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.3. A, B, C und D).

Tabelle 3.2

	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
scheinoperiert	$98 \pm 4 \%$	$< 0,001$	$98 \pm 4 \%$	$< 0,001$
Normothermie	$64 \pm 4 \%$	$0,048$	$43 \pm 4 \%$	$< 0,001$
Hypothermie	$74 \pm 16 \%$		$87 \pm 16 \%$	

Tabelle 3.2: Kollagen Typ IV der zerebralen Gefäße im Kortex und in den Basalganglien im Vergleich von scheinoperierten Tieren zu den Tieren mit Ischämie/Reperfusion unter hypothermen und normothermen Bedingungen. Es wurde jeweils das Verhältnis aus der ischämischen mit der nichtischämischen kontralateralen Seite berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 6 Tieren \pm Standardfehler von jeweils sechs Versuchen.

Abbildung 3.3

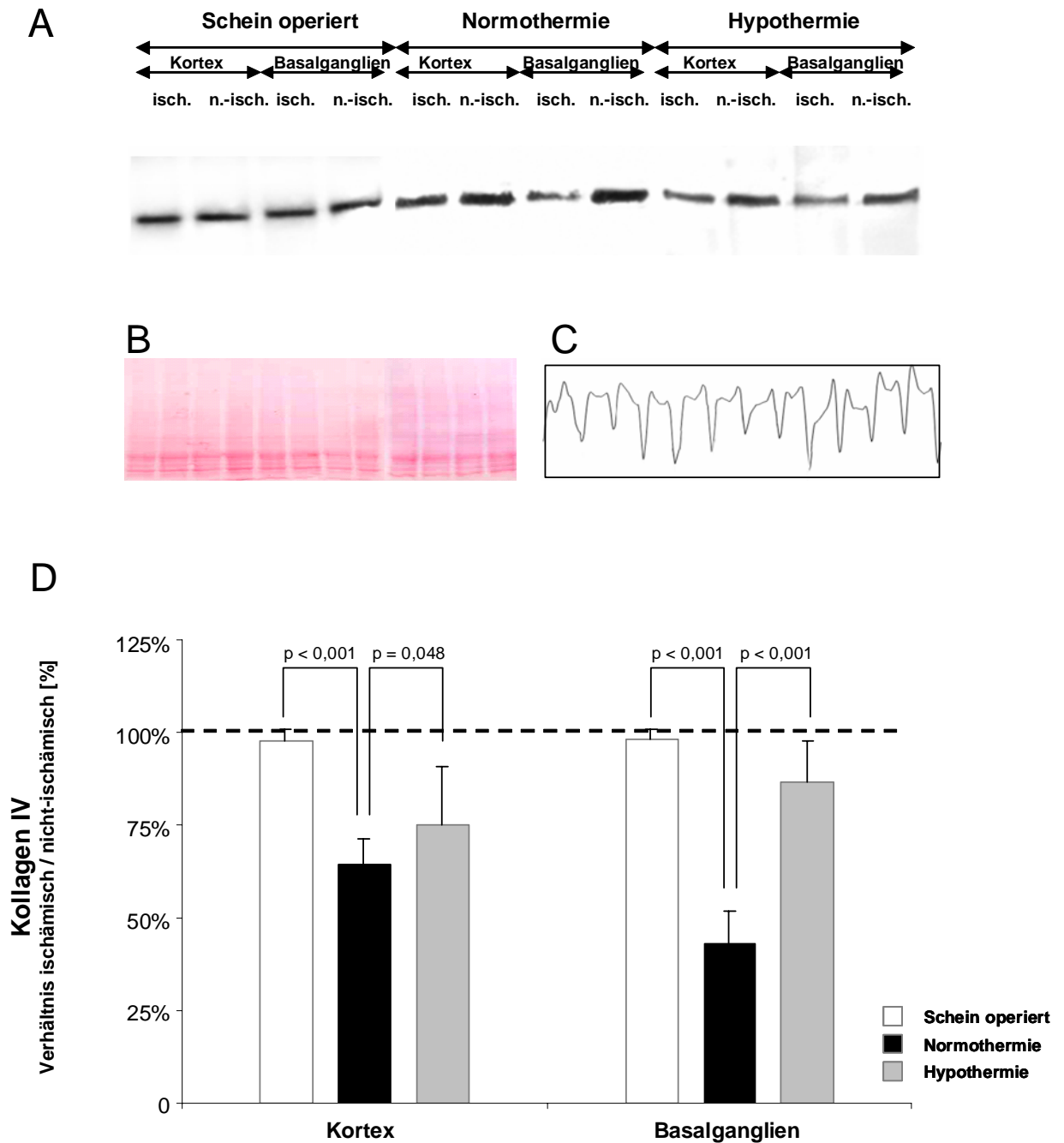


Abbildung 3.3: Kollagen Typ IV Gehalt nach Ischämie und Reperfusion unter hypothermen Bedingungen.

(A): Western Blot von Proteinlysaten aus getrennten Gehirnarealen. Dabei wurde in ischämischen und nichtischämischen Kortex und ischämische und nichtischämische Basalganglien geteilt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.4.2.). Für jede Gruppe scheinoperiert, Normothermie und Hypothermie wurde ein exemplarisches Gel abgebildet.

(B): Ponceau S-Färbung der aufgetragenen Gesamtproteine.

(C): Profil der optischen Dichte der Gesamtproteine.

(D): Die Menge des Kollagen IV der ischämischen Seite wurde relativ zur kontralateralen Kontrollseite des Gehirns berechnet (%). 100% bedeutet kein Verlust von Kollagen IV in der ischämischen Hemisphäre. Es wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 6 unabhängigen Tieren dargestellt.

3.5. Verminderung der Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen aus den zerebralen Gefäßen

Durch die Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer Schädigung der Mikrogefäße. Blut kann in das Gehirngewebe eindringen. Die Menge an, aus den Gefäßen ausgetretenem Hämoglobin wurde in dieser Arbeit als Ausdruck der Schädigung der Integrität der zerebralen Gefäße angesehen. Es wurde vorausgesetzt, dass das Hämoglobin nicht hämolytisch im Serum vorhanden war. Um zu verhindern, dass verbleibendes Blut in den Gefäßen nach der Operation die Ergebnisse verfälscht, erfolgte eine lange und intensive Perfusionsphase vor und während der Tötung der Tiere (Operationsbeschreibung siehe Kapitel 2.1.2.2.)

In der Gruppe der normothermen Tiere führte die Ischämie zu einer Steigerung der Extravasation von Hämoglobin in der ischämischen Hemisphäre auf $431 \pm 65\%$ in den Basalganglien und auf $197 \pm 25\%$ im Cortex verglichen mit der nichtischämischen Kontrollseite (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.4. A, B, C und D).

Hypothermie reduzierte die Extravasation von Hämoglobin in der ischämischen Hemisphäre auf $241 \pm 28\%$ in den Basalganglien und auf $163 \pm 10\%$ im Kortex im Vergleich zu der nichtischämischen Hemisphäre (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.4. A, B, C und D).

Die Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere zeigte ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis der beiden Hemisphären (Basalganglien $116 \pm 17\%$ und Kortex $96 \pm 11\%$) (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.4. A, B, C und D).

Tabelle 3.3

	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
scheinoperiert	116 ± 17 %	< 0,001	96 ± 11 %	< 0,001
Normothermie	197 ± 25 %	0,048	431 ± 65 %	< 0,001
Hypothermie	163 ± 10 %		241 ± 28 %	

Tabelle 3.3: Gehalt von Hämoglobin im Kortex und der Basalganglien von scheinoperierten Tieren und Tieren mit Ischämie/Reperfusion mit Hypothermie oder Normothermie behandelt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Relation zwischen ischämischer und nichtischämischer Hemisphäre. Die statistische Analyse zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mit dem Student t-Test.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils 6 Tieren.

Abbildung 3.4

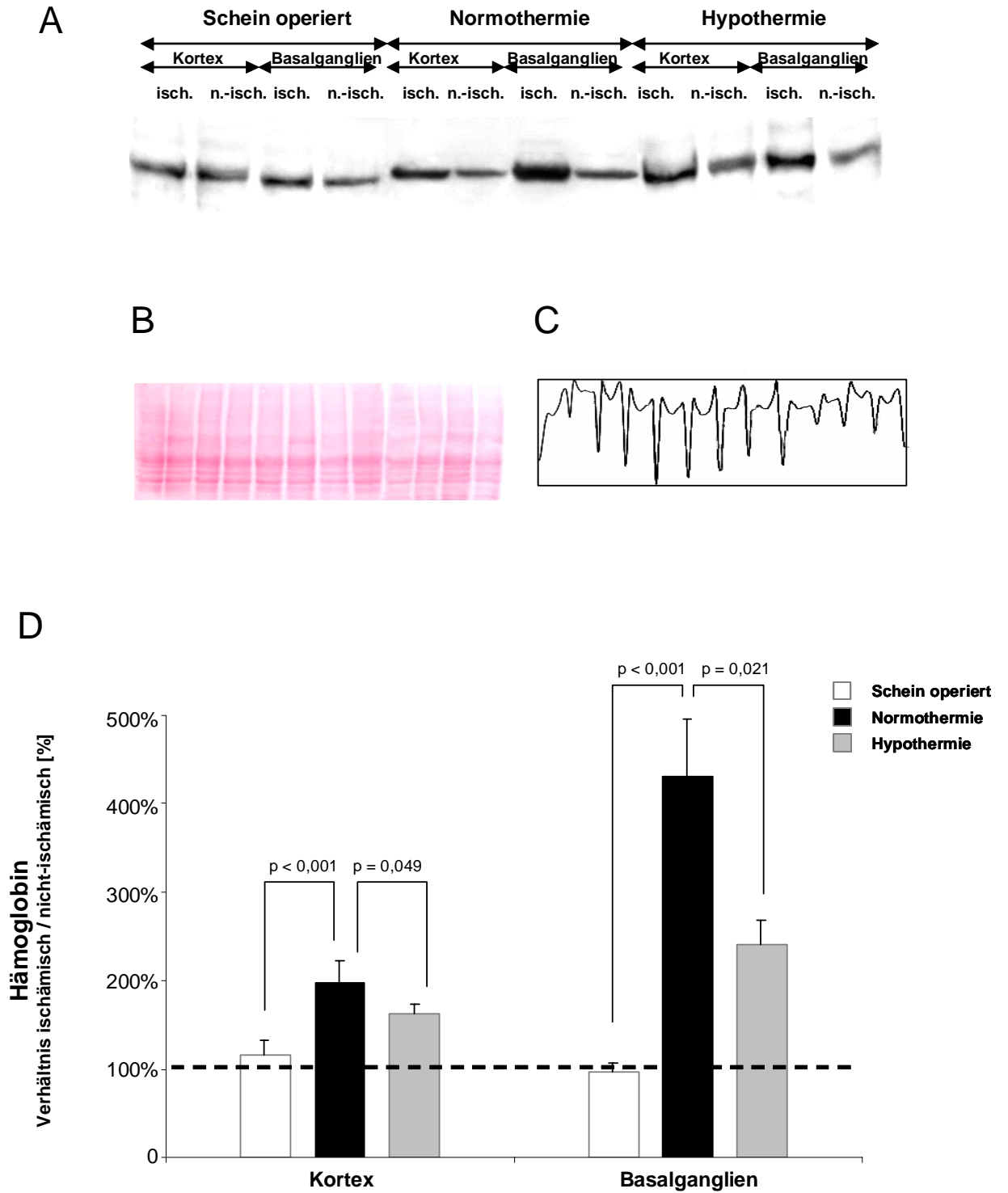


Abbildung 3.4: Extravasation von Hämoglobin bei scheinoperierten Tieren nach 3h Ischämie und 24 Stunden Reperfusion unter normothermen und hypothermen Bedingungen.

(A): Western Blot von Proteinlysaten aus getrennten Gehirnarealen. Dabei wurde in ischämischen und nichtischämischen Kortex und ischämische und nichtischämische Basalganglien geteilt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.4.2). Für jede Gruppe scheinoperiert, Normothermie und Hypothermie wurde ein exemplarisches Gel abgebildet.

(B): Ponceau S Färbung der auf die Blotmembran aufgetragenen Gesamtproteine.

(C): Profil der optischen Dichte der Gesamtproteine.

(D): Die Menge des Hämoglobin der ischämischen Seite wurde relativ zur kontralateralen Kontrollseite des Gehirns berechnet (%). 100% bedeutet kein Verlust von Hämoglobin in der ischämischen Hemisphäre. Es wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils 6 unabhängigen Tieren dargestellt.

3.6. Konzentration von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs)

Die Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und MMP-9 können in Geweben Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin abbauen und so die Integrität der Basalmembran schädigen.

Eine 3-stündige Ischämie mit einer 24-stündigen Reperfusion steigert die Konzentration von MMP-2 und MMP-9. In der Versuchsgruppe mit Normothermie zeigt der Vergleich von ischämischer zu nichtischämischer Hemisphäre eine Steigerung der MMP-2 Werte im Kortex auf $116 \pm 1\%$ und in den Basalganglien einen Wert von $109 \pm 3\%$. Auch die Konzentration von MMP-9 war erhöht nach der 3-stündigen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion. Im Kortex zeigte sich bei den normothermen Versuchstieren eine MMP-9 Erhöhung auf $123 \pm 3\%$ in Bezug zur nichtischämischen Kontrollseite und in den Basalganglien eine Erhöhung auf $115 \pm 4\%$ (siehe Tabelle 3.4. A+B, Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6. A+B).

In der Versuchsgruppe der scheinoperierten Kontrollen zeigten sich keine Unterschiede in den MMP-2 und MMP-9 Aktivitäten auf der ipsilateralen Seite verglichen mit der contralateralen Kontrollseite (siehe Tabelle 3.4. A+B, Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6. A+B).

In der Versuchsgruppe mit Hypothermie war der Wert von MMP-2 und MMP-9 signifikant reduziert. MMP-2 wurde im Kortex auf $53 \pm 6\%$ im Vergleich von ischämischer zu nichtischämischer Hemisphäre hoch signifikant reduziert und auf $71 \pm 20\%$ in den Basalganglien ($P < 0,001$). Auch MMP-9 wurde im Kortex auf $16 \pm 4\%$ und in den Basalganglien auf $38 \pm 12\%$ signifikant reduziert ($p < 0,001$) (siehe Tabelle 3.4. A+B, Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6. +B).

Tabelle 3.4. A

MMP-2	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
scheinoperiert	$99 \pm 13 \%$	0,049	$109 \pm 13 \%$	0,51
Normothermie	$116 \pm 1 \%$	< 0,001	$109 \pm 3 \%$	< 0,001
Hypothermie	$53 \pm 6 \%$		$71 \pm 20 \%$	

Tabelle 3.4. B

MMP-9	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
scheinoperiert	97 ± 6 %	< 0,001	99 ± 7 %	0,0,38
Normothermie	123 ± 3 %	< 0,001	115 ± 4 %	< 0,001
Hypothermie	16 ± 4 %		38 ± 12 %	

Tabelle 3.4. A+B: Expression der MMP-2 und MMP-9 im Kortex und in den Basalganglien der drei Versuchsgruppen. Die Lysezonen der Zymographien wurden in Werte für optische Dichte übersetzt und das Verhältnis (%) der ischämischen zur nichtischämischen Kontrollseite (getrennt für Kortex und Basalganglien) aufgelistet. Dabei zeigt sich in der Gruppe der Normothermie ein signifikanter Anstieg der MMPs, der durch eine Hypothermie signifikant vermindert wird. In der scheinoperierten Tiergruppe zeigt sich kein Unterschied der MMP-2/-9 Mengen in der ipsilateralen Gehirnseite verglichen mit der contralateralen Seite (Sollwert = 100%). Vergleich der Gruppen untereinander durch den Student t-Test. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler.

Abbildung 3.5

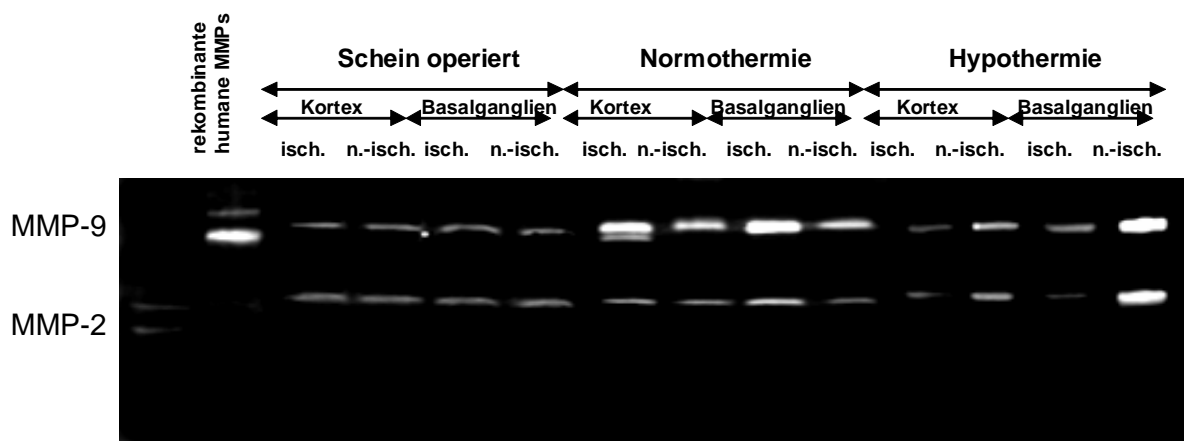


Abbildung 3.5:

Gelatine Zymographie: Repräsentatives Zymogramm der Proteinextrakte aus jeweils einem Gehirn der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Als Positivkontrollen wurden rekombinante humane MMP-2 und MMP-9 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufgetragen. In den unterschiedlichen Spuren wurde jeweils Proteinextrakt aus der ischämischen und nichtischämischen Seite des Kortex und der Basalganglien aufgetragen. Nach der Elektrophorese

wurden die Proteine renaturiert und in einem angepassten Puffer (siehe Material und Methoden Kapitel 2.2.4.3.) inkubiert. Nach Färbung des Gels mit Cromassie-Blau waren die gelatinolytischen Aktivitäten der MMPs als klare Lysezonen zu detektieren.

Abbildung 3.6

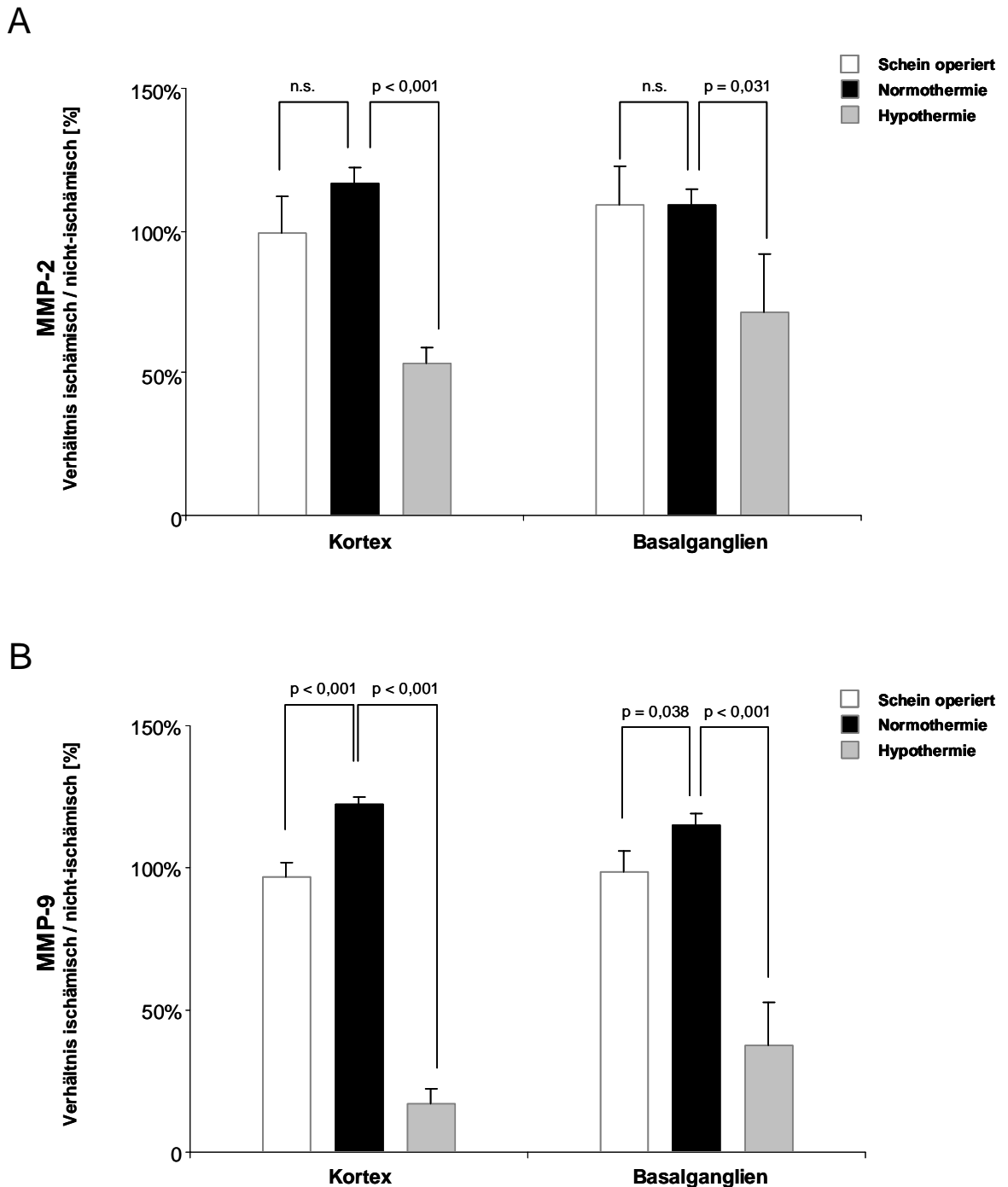


Abbildung 3.6: Relative Werte zwischen ischämischer und nichtischämischer Kontrollseite für die beiden MMPs MMP-2 (A) und MMP-9 (B) getrennt für kortikale Bereiche und Bereiche der Basalganglien. Dabei zeigt sich nach einer 3-stündigen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion

unter normothermen Bedingungen, dass die Werte von MMP-2 und MMP-9 ansteigen. Eine Hypothermie vermindert hoch signifikant diesen Anstieg der MMP-2 und MMP-9 ($p < 0,001$) (Student t-Test). Die Werte sind Mittelwerte aus allen Tieren einer Gruppe (N =6).

3.7. Einfluß der Hypothermie auf die enzymatische Aktivität der endogenen Plasminogen-Aktivatoren

Endogenen Plasminogen-Aktivatoren wie t-PA und uPA könnten mitverantwortlich für die Schädigung der Basalmembran sein. Sie wirken dabei vor allem durch ihre Rolle bei der Aktivierung des Plasmins aus seinem Vorläuferprotein Plasminogen.

Die Aktivität von t-PA veränderte sich nach einer 3-stündigen Ischämie und Reperfusion (24 h) unter normothermen Bedingungen nicht: Kortex: $101 \pm 8\%$ und Basalganglien $111 \pm 13\%$ (Werte jeweils Verhältnis ischämische zu nichtischämische Seite; siehe Tabelle 3.5. A, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8. A).

In der Versuchsgruppe der hypotherm behandelten Tiere reduzierte sich die Aktivität von t-PA im Kortex auf $91 \pm 15\%$ und auf $61 \pm 17\%$ in den Basalganglien ($p = 0,021$) (siehe Tabelle 3.5. A, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8. A).

Die scheinoperierten Kontrolltiere d.h. die keine Ischämie hatten, zeigten wie zu erwarten, keinen Unterschied in der t-PA Aktivität der beiden Hemisphären (siehe Tabelle 3.5. A, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8. A).

In Gegensatz zu t-PA war die u-PA Aktivität im Kortex nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Versuchsgruppe mit Hypothermie ($180 \pm 27\%$) und Normothermie ($176 \pm 10\%$), jedoch gab es einen hoch signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) zu den scheinoperierten Kontrolltieren (siehe Tabelle 3.5. B, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8. B). Im Gegensatz zum Kortex ließ sich in den Basalganglien bei der normothermen Versuchsgruppe ein sehr starker Anstieg der u-PA Aktivität auf $1019 \pm 22\%$ zeigen. Die Hypothermiebehandlung reduzierte diesen Anstieg der Aktivität von u-PA hoch signifikant auf $310 \pm 86\%$ ($p < 0,001$) (siehe Tabelle 3.5 B, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8. B).

Tabelle 3.5. A

t-PA	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
Scheinoperiert	95 ± 5 %	0,089	105 ± 1 %	0,246
Normothermie	101 ± 8 %	0,112	111 ± 13 %	0,021
Hypothermie	91 ± 15 %		61 ± 17 %	

Tabelle 3.5. B

uPA	Kortex	t-test: p =	Basalganglien	t-test: p =
Scheinoperiert	95 ± 7 %	0,039	101 ± 8 %	0,002
Normothermie	176 ± 10 %	0,051	1019 ± 22 %	0,024
Hypothermie	180 ± 27 %		310 ± 86 %	

Tabelle 3.5. A+B: Expression der Plasminogen Aktivatoren t-PA (A) und uPA (B) im Kortex und in den Basalganglien der drei Versuchsgruppen. Die Lysezonen der Zymographien wurden in Werte für optische Dichte übersetzt und das Verhältnis (%) der ischämischen zur nichtischämischen Kontrollseite (getrennt für Kortex und Basalganglien) aufgelistet. Dabei zeigt sich in der Gruppe der Normothermie ein signifikanter Anstieg von u-PA, der durch eine Hypothermie signifikant vermindert wird. In der scheinoperierten Tiergruppe zeigt sich kein Unterschied der PA Mengen in der ipsilateralen Gehirnseite verglichen mit der kontralateralen Seite (Sollwert = 100%). Vergleich der Gruppen untereinander erfolgte durch den Student t-Test. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler.

Abbildung 3.7

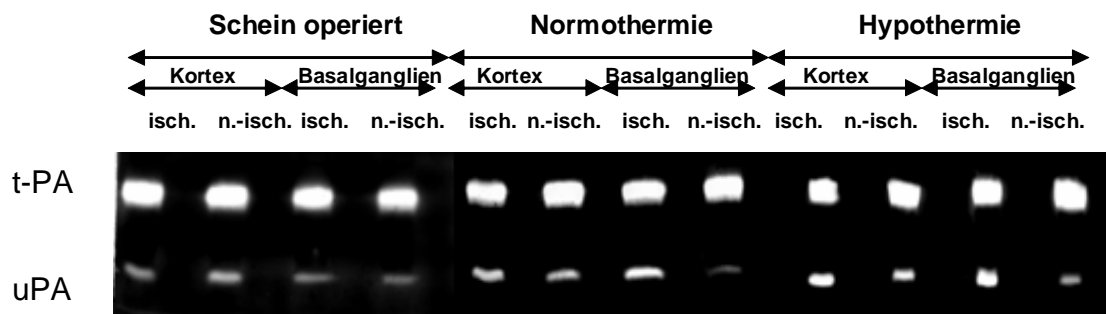


Abbildung 3.7:

Plasminogen-abhängige-Casein-Zymographie: Repräsentatives Zymogramm der Proteinextrakte aus jeweils einem Gehirn der unterschiedlichen Versuchsgruppen. In den unterschiedlichen Spuren wurde jeweils Proteinextrakt aus der ischämischen und nichtischämischen Seite des Kortex und der Basalganglien aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine renaturiert und in einem angepassten Puffer (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.4.4) inkubiert. Nach Färbung des Gels mit Cromassie-Blau waren die gelatinolytischen Aktivitäten der Plasminogen-Aktivatoren als klare Lysezonen bei dem Molekulargewicht von 46 kDa (u-PA) und 64 kDa (t-PA) zu detektieren.

Abbildung 3.8. A+B

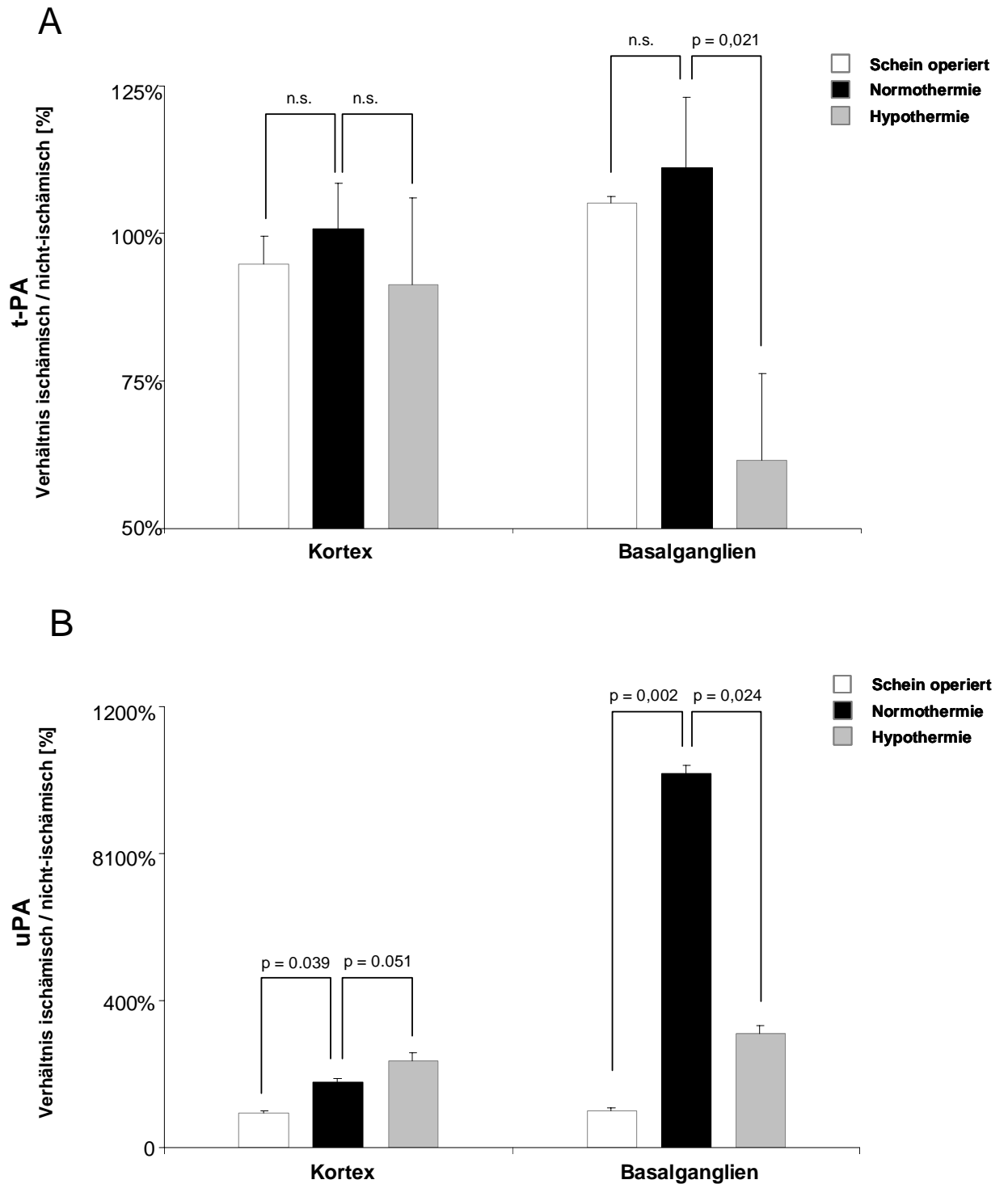


Abbildung 3.8. A+B: Relative Werte zwischen ischämischer und nichtischämischer Kontrollseite für die beiden Plasminogen Aktivatoren t-PA (A) und u-PA (B) getrennt für kortikale Bereiche und

Bereiche der Basalganglien. Dabei zeigt sich nach einer 3-stündigen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion unter normothermen Bedingungen, dass die Werte von t-PA unverändert bleiben. Ein signifikanter Anstieg erfolgte durch die Ischämie/Reperfusion bei der u-PA in den Basalganglien. Hypothermie vermindert signifikant diesen Anstieg der u-PA. Die Werte sind Mittelwerte aus allen Tieren einer Gruppe (N =6).

4. Diskussion

4.1. Allgemeiner Teil

4.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde der Einfluß einer zerebralen Hypothermie auf die Integrität der Basalmembran bei einer 3-stündigen transienten fokalen zerebralen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion untersucht und zum ersten Mal der Temperaturverlauf des Gehirnes und der Umgebungstemperatur kontinuierlich gemessen und dargestellt.

So konnte gezeigt werden, dass eine durch extrakorporale Kühlung erzeugte postischämische Hypothermie bei einer 3-stündigen fokalen zerebralen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion das Infarktvolume signifikant reduziert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch eine Hypothermie die Destruktion der Basalmembran, d.h. der postischämische Abbau von Kollagen Typ IV aus der Basalmembran, signifikant reduziert wird.

Zusätzlich ließ sich nachweisen, dass der Austritt von korpuskulären Blutbestandteilen aus den Gefäßen in das Gewebe, hier Hämoglobin als Ausdruck der korpuskulären Extravasation, durch eine postischämische Hypothermie signifikant vermindert werden konnte.

Als mögliche Schädigungsmechanismen sind zum einen der Anstieg von Matrix-Metallo-Proteinasen, zum anderen der Anstieg von endogenen Plasminogen-Aktivatoren in der Diskussion. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine postischämische Hypothermie sowohl den Anstieg der Konzentration der Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und MMP-9, sowie auch den Anstieg der enzymatischen Aktivität der endogenen Plasminogen-Aktivatoren tissue-Plasminogen-Aktivator und u-Plasminogen-Aktivator signifikant vermindert.

4.1.2. Validität und Grenzen des verwendeten Ischämie Modells

In den hier vorgestellten Untersuchungen zu einer transienten fokalen zerebralen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion und postischämischer Hypothermie bei der Ratte wurden zwei Tiermodelle kombiniert.

Zum einen das Intraluminale-Faden-Okklusions-Modell von Zea Longa et al. (Zea Longa et al., 1989) und zum anderen das Hypothermiemodell durch extrakorporale Kühlung von Yanamoto et al., (Yanamoto et. al., 2001).

Bei dem Ischämie Modell von Zea Longa et al. wird die Arteria cerebri media (MCA) mittels eines von der Arteria carotis communis (CCA) intraluminal vorgeschobenen monofilären Fadens verschlossen. Dies erzeugt eine Ischämie im Mediastromgebiet.

Im Gegensatz zu anderen Ischämie modellen (Laas et al., 1983; Koizumi et al., 1985) liegen die Vorteile dieser Methode bei der einfachen, relativ gering invasiven Art der Ischämieinduktion ohne Kraniotomie. Mit dieser Methode ließ sich eine stabile Verminderung der zerebralen Durchblutung im betroffenen Gebiet auf 20-30% des Ausgangswertes erreichen (Zea Longa et al., 1989; Sporer et al., 1997). Die hiermit erzeugten Infarktgrößen sind, besonders in den Basalganglien, als relativ konstant anzusehen (Zea Longa et al. 1989; Hamann et al. 1998; siehe auch eigene Werte in Kap. 3). Eine Kontrolle der verminderten zerebralen Durchblutung mittels der Laser-Doppler-Methode in Relation zur Infarktgröße wurde in Voruntersuchungen durchgeführt und in den jetzigen Untersuchungen nicht zusätzlich kontrolliert (Sporer et al., 1997; Hamann et al., 1998).

Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Wiedereröffnung der MCA durch einfaches Zurückziehen des Fadens zur Einleitung der Reperfusion. Durch den Einsatz der Laser-Doppler-Messung konnte in den oben erwähnten Voruntersuchungen die Reperfusion kontrolliert und über die Zeit verfolgt werden. Jedoch kann dieses Modell des mechanischen transienten Mediaverschlusses nur sehr eingeschränkt mit der Situation eines thrombotischen Mediaverschlusses bei Menschen verglichen werden. Der mechanische Verschluss eines Gefäßes vernachlässigt völlig die Interaktionen eines festsitzenden Thrombus mit dem Endothel und dem Gerinnungssystem (Hossmann, 1997; Prado et al., 1996). Möglich wäre auch eine nachträgliche Thrombosierung des Gefäßes nach Zurückziehen des Fadens mit einer unvollständigen Reperfusion. In Voruntersuchungen durch unsere Arbeitsgruppe, in denen die Durchblutung des ischämischen Areals mittels der Laser-Doppler-Methode kontrolliert wurde, kam es nicht zu einer nachträglichen Thrombosierung der A. cerebri media (MCA) oder zu einer unvollständigen Reperfusion (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Da jedoch bei den hier vorgestellten Versuchen auf eine Laser-Doppler-Kontrolle verzichtet wurde, läßt sich eine Thrombosierung der MCA und einer möglicherweise unvollständigen Reperfusion nicht vollständig ausschließen. Eine weitere methodische Schwäche des Fadenokklusionsmodells liegt in der möglichen Irritation des Endothels, einer Endothelabrasion oder Gefäßruptur durch den vorgeschobenen Faden. Es wurde durch das Design (Silikonbeschichtung), die Art des Vorschubs und die Durchmesseradaptation (an das Tiergewicht) des Fadens versucht, die möglichen Beeinträchtigungen für das Endothel gering zu halten. In eigenen unveröffentlichten Vorversuchen, bei denen die Reperfusion mittels Laser-Doppler kontrolliert wurde, kam es zu keinem Gefäßspasmus oder zu einer Endothelabrasion. Da bei diesen Versuchen auf eine Laser-Doppler-Kontrolle verzichtet wurde, kann eine Endothelirritation oder –abrasion nicht mit Sicherheit

ausgeschlossen werden. Eine Ruptur der A. cerebri media konnte jedoch, wie in Kapitel 2 beschrieben, durch Kontrolle der Schädelbasis auf Blutclots ausgeschlossen werden.

Das Modell einer transienten Okklusion mit anschließender Reperfusion unterscheidet sich stark von einer permanenten Okklusion. In der Reperfusion kommt es zu einer Wiederdurchblutung der verschlossenen Gefäße und somit zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Substraten. So ist es möglich, dass die sauerstoffabhängigen Reaktionen von spezifischen und unspezifischen Enzymen, wie Matrix-Metallo-Proteinasen oder endogene Plasminogen-Aktivatoren wieder, möglicherweise gesteigert, ablaufen können. Dies könnte den Reperfusionsschaden verursachen (del Zoppo et al., 1998).

Im klinischen Alltag läßt sich die permanente Okklusion beim Menschen eher selten nachweisen. Vielmehr scheint eher die transiente Okklusion mit anschließender Reperfusion nach 4 bis 48 Stunden die Regel zu sein. In dieser Hinsicht imitiert das Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie die klinische Situation, um relevante Antworten auf das Verhalten der Gefäße bzw. die Schädigung der Basalmembran in der Phase der Reperfusion zu geben.

4.1.3. Validität und Grenzen des verwendeten Hypothermiemodells

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde die zerebrale Hypothermie mittels extrakorporaler Kühlung nach dem Hypothermiemodell nach Yanamoto et al. erzeugt (Yanamoto et al., 2001). Bei diesem Modell wird die Hypothermie durch das Verbringen des wachen Versuchstieres in eine kalte Umgebung bewirkt, so dass bei einer $5 \pm 2^\circ\text{C}$ kalten Umgebung eine milde bis moderate zerebrale Hypothermie um $32 \pm 2^\circ\text{C}$ entsteht. Aus eigenen unveröffentlichten Daten konnte gezeigt werden, dass diese Methode nur bei Ratten mit einer Ischämie eine Hypothermie bewirkte. Unbehandelte Ratten hatten eine Normothermie (eigene unveröffentlichte Daten).

Bei den derzeit vorliegenden experimentellen Methoden zur Induktion einer zerebralen Hypothermie lassen sich grundsätzlich verschiedene Formen unterscheiden. Es kann zwischen der Lokalisation der Hypothermie (lokale zerebrale Hypothermie oder Ganzkörperhypothermie) und der Art der Kühlung (extra- oder intrakorporale Kühlung) unterschieden werden. Eine extrakorporale Kühlung ist durch kalte Medien wie Eis, Luft oder Alkohol möglich. Bei der intrakorporalen Kühlung kann die Kühlung durch einen endovaskulären Kühlkatheter oder einen extrakorporalen Bypass z.B. eine Herz-Lungen-Maschine bewerkstelligt werden. Alle Kombinationen zwischen diesen Methoden sind möglich und wurden in der Geschichte schon ausprobiert (Ginsberg et al., 1992; Roy et Ray, 2004).

Der Vorteil der hier verwendeten Methode liegt in der leichten und, verglichen mit anderen Induktionsformen einer Hypothermie, wenig apparateintensiven Induktion der Hypothermie. So müßten die Versuchstiere bei einer Kühlung über eine Kältematte, durch einen endovaskulären Kühlkatheter oder einen extrakorporalen Bypass in Vollnarkose sein, was die Überlebensrate bei einer Versuchsdauer von über insgesamt 30 Stunden sehr mindert, wenn nicht gar unmöglich macht (De Georgia et al., 2004; Ginsberg et al., 1992; Meier et al., 1998; Kawei et al., 2000; Krieger et al., 2001). Da hier die Temperatur im Muskelus temporalis gemessen wurde, musste bei diesem Hypothermiemodell keine Kraniotomie zum Legen und Plazieren des Temperatursensors durchgeführt werden. In Vorversuchen wurde die Temperatur im Muskelus temporalis mit der Hirntemperatur verglichen und kalibriert (eigene unveröffentlichte Daten; Meier et al., 1998).

Nebenwirkungen der Hypothermie wie Herzrhythmus- oder Gerinnungsstörungen oder Erfrierungen der Haut durch den direkten Kontakt mit dem Kühlmedium, z. B. Eispackungen oder Alkohol (Ginsberg et al., 1992; Meier et al., 1998) konnten, bis auf ein gelegentliches Muskelzittern, nicht beobachtet werden. Die Versuchstiere tolerierten das Vorgehen sehr gut und zeigten bis auf das bereits erwähnte gelegentliche Kältezittern, keine Zeichen von Beeinträchtigung ihres Wohlbefindens. Das Ausmaß der Nebenwirkungen oder Komplikationen der Hypothermie sind mit dem Tiefegrad korreliert. Bei einer milden oder moderaten Hypothermie sind die Nebenwirkungen weit weniger ausgeprägt als bei einer schweren Hypothermie. Dies war der Grund, die durchgeführten Untersuchungen mit einer milden bis moderaten Hypothermie durchzuführen.

Der Nachteil dieser Methode liegt in der Übertragbarkeit auf den Menschen. Es ist ein großer apparativer Aufwand nötig, um beim Menschen die Körperkerntemperatur mittels extra- oder intrakorporaler Kühlung auf eine milde bis moderate Hypothermie abzusenken. Dies ist z. Z. nur unter intensivmedizinischer Überwachung möglich. Um die bekannten Nebenwirkungen der Hypothermie wie Herzrhythmus- oder Gerinnungsstörungen, Muskelzittern oder Kälteschäden der Haut zu minimieren, sollten die Patienten sediert oder intubiert, beatmet und relaxiert sein (Krieger et al., 2001).

4.2. Spezieller Teil

4.2.1. Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Infarktgröße

Ein Teilergebnis dieser Studie zeigt, dass eine milde bis moderate postischämische 24-stündige Hypothermie die Infarktgröße bei einer 3-stündigen zerebralen fokalen Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion signifikant reduziert.

Die Reduktion der Infarktgröße betrug bei dieser Versuchsanordnung im Mittel um 21% (siehe Kap.3.3.). Dabei zeigte sich eine größere Streubreite der Infarktgrößen bei den kortikalen Infarkten im Gegensatz zu den Infarkten in den Basalganglien. Dieser Effekt zeigte sich schon in früheren Untersuchungen an der Ratte und auch beim Menschen (Hamann et al., 2002; Doerfler et al., 2001; Kollmar et al., 2002; Meng et al., 1999; Laptook et al., 1997). Ähnliche oder gar ausgeprägtere Reduktionen des Infarktes werden auch von anderen Untersuchern gezeigt. So berichten Kawai et al. von einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße um teilweise $\geq 50\%$ der kortikalen Infarkte. In Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde bei den subkortikalen Infarkten nur eine Reduktion um 30% beobachtet, die jedoch nicht signifikant war (Kawai et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die Untersuchungen von Yanamoto et al. und Scholler et al.. So berichtet Yanamoto hier von einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße von ca. 50% nach 24-stündiger Reperfusion. Interessanterweise konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Infarktgröße erst nach 48 Stunden Reperfusion ihre volle Größe erreicht hatte. Dieses Ergebnis hatte jedoch keinen Einfluß auf die Relation der Infarktgrößenreduktion (Yanamoto et al., 2001; Scholler et al., 2004). Obwohl eine ähnliche Modellanordnung gewählt wurde, unterscheiden sich die Versuche jedoch in der Tierrasse (Hamann: Wistar- vs. Yanamoto: Sprague-Dawley- vs. Kawai: Sprague-Dawley-Ratten) und der Tiefe der Hypothermie bzw. der Hirntemperatur (milde bis moderate vs. milde und moderate vs. milde Hypothermie). Auch in der Ischämie- und Reperfusionsdauer (3h- vs. 2h-Ischämie und 24h- vs 24/48h- vs. 22h-Reperfusion) und der Art der Färbung zur Infarktgrößenbestimmung (MAP-2-Färbung vs. TTC-Färbung/Cresyl-Violett/GFAP- vs. TTC-Färbung) wiesen die Untersuchungen Unterschiede auf. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Auch spielen sicherlich unterschiedliche Modifikationen des Ischämie-modells, d.h. der unterschiedlichen zusätzlichen Okklusion der hirnversorgenden Gefäße eine Rolle (Okklusion der linken CCA (Arteria carotis communis) und MCA (Arteria cerebri media) vs beider CCA und MCA vs. CCA, PPA (Arteria pterygopalatina) und MCA).

Zusammenfassend zeigt sich jedoch, dass eine postischämische Hypothermie nach einer zerebralen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion die Infarktgröße signifikant reduziert. Das Ausmaß der Reduktion hängt wahrscheinlich von der unterschiedlichen Versuchsanordnung ab, jedoch bedarf dies noch weiterer Untersuchungen.

4.2.2. Der Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Morphologie und Integrität der mikrovaskulären Basalmembran

Das Hauptergebnis dieser Studie ist, dass eine postischämische milde bis moderate Hypothermie den Antigenverlust bzw. den Verlust von Kollagen Typ IV der mikrovaskulären Basalmembran und die nachfolgende Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen bei einer fokalen zerebralen Ischämie vermindern kann. Dabei wurde Hämoglobin als Ausdruck der korpuskulären Extravasation im Gewebe bestimmt.

Die Degradation der Basalmembran beginnt wahrscheinlich sehr früh bei einer zerebralen Ischämie. So zeigen Untersuchungen der Arbeitsgruppen um G. del Zoppo und unserer Arbeitsgruppe von G.F. Hamann einen signifikanten Verlust der strukturellen Proteine Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV der Basalmembran in den ersten 24 Stunden der Reperfusion. Dies konnte an verschiedenen Spezies wie Pavian und Ratte nachgewiesen werden (del Zoppo et al., 1998; Dijkhuizen et al., 2001; Hamann et al., 1996; Hamann et al., 1995; Hamann et al., 1999; Hamann et al., 2002; Zhang et al., 2001). Eine ähnlich große Ausprägung des mikrovaskulären Schadens bei normothermen Kontrollgruppen wurde schon früher beschrieben (Hamann et al., 1995; Hamann et al., 1999; Hamann et al., 2002; Hamann, 2003; Yepes et al., 2000). In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine postischämische milde bis moderate Hypothermie nach einer Ischämie mit anschließender Reperfusion den Verlust von Kollagen Typ IV aus der Basalmembran der zerebralen Mikrogefäße der Ratte signifikant reduziert (siehe Kapitel 3.4; Hamann et al., 2004).

Zusätzlich wird, wie aufgrund der Literatur zu erwarten gewesen wäre, die Infarktgröße signifikant reduziert (siehe Kapitel 3.3; Yanamoto et al., 2001; Kawai et al., 2000). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der nachfolgende Austritt von korpuskulären Blutbestandteilen aus den Gefäßen, nachgewiesen durch die Extravasation von Hämoglobin, signifikant reduziert wurde. So verringerte die postischämische Hypothermie den Austritt von Hämoglobin aus den zerebralen Mikrogefäßen in das umgebene Parenchym. Zusätzlich zu der Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen kommt es zu einem Austritt von intravaskulärer Flüssigkeit in das umgebene Parenchym. Dies führt zu der Entwicklung des bekannten Ödems nach einer Ischämie (del Zoppo et al., 1998). Die Auswirkungen der Hypothermie auf das zerebrale Ödem bzw. die Ödementwicklung wurde in dieser Studie nicht untersucht. Jedoch konnte in der Untersuchung von Yanamoto et al. eine signifikante Verringerung der Ödementwicklung durch eine postischämische Hypothermie nachgewiesen werden (Liebetau et al., 2004; Yanamoto et al., 1999; Yanamoto et al., 2001).

Für die protektive Wirkung der Hypothermie auf die Basalmembran werden in der Literatur verschiedene Ursachen diskutiert. Die Verminderung des ischämischen Schadens durch eine Hypothermie könnte einerseits durch die allgemeine Verminderung des Stoffwechsels, andererseits durch Hemmung oder Unterdrückung spezifischer Schädigungsmechanismen verursacht sein (Ginsberg et al., 1992).

Es ist bekannt, dass Plasmin als breitwirksame unspezifische Serinprotease verschiedene Proteine der Basalmembran wie Kollagen oder Fibronectin hydrolysieren kann. Um wirksam zu sein, muß es durch endogene Plasminogenaktivatoren wie t-PA oder u-PA, aus seiner inaktiven Pro-Form Plasminogen aktiviert werden. Der protektive Effekt einer Hypothermie könnte in der verminderten Synthese oder der verminderten enzymatischen Aktivität dieser Plasminogenaktivatoren liegen (siehe Kapitel 4.2.3).

Ein anderer möglicher Schädigungsmechanismus könnte durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) wie MMP-2 und MMP-9 verursacht werden. Wie Plasmin müssen diese Proteinasen um wirksam zu sein, erst aus ihren inaktiven Pro-Formen gebildet werden. Der protektive Effekt könnte wie bei Plasmin aus der verminderten Synthese oder der verminderten enzymatischen Aktivität dieser Proteinasen bestehen (siehe Kapitel 4.2.3).

Ein dritter möglicher Schädigungsmechanismus könnte die verminderte Ausschüttung von proteolytischen Enzymen aus der Granula von polymorphkernigen Leukozyten (PMN-Leukozyten) sein (del Zoppo et al., 1998; McManus et al., 2004; Ponnampalam et Mayberg, 2004).

Heck et al. konnten zeigen, dass PMN-Leukozyten bei einer zerebralen Ischämie aktiviert werden (Heck et al., 1990). Diese Aktivierung führt zu einer Ausschüttung von Enzymen wie Kollagenase (MMP-8), Elastase und Cathepsin G, die Proteine der Basalmembran wie Laminin und Kollagen abbauen können (Murphy et al., 1987; Watanabe et al., 1990; Heck et al., 1990; Pike et al., 1989). Der Einfluß der PMN-Leukozyten und ihrer Granula wurde jedoch in unserer Studie nicht berücksichtigt.

Der Einfluß der endogenen Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA und der Matrix-Metallo-Proteinasen wird im nächsten Kapitel diskutiert (siehe Kap. 4.2.3.).

4.2.3. Der Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf endogene Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metallo-Proteinasen

Endothelzellen mit interendothelialen tight-junctions bilden das morphologische Korrelat der Blut-Hirn-Schranke (del Zoppo et al., 1998). Diese endotheliale Barriere, funktionell als Blut-Hirn-Schranke bezeichnet, reguliert den Substrattransfer zwischen Hirnzellen (Neuronen), Extrazellulärraum und dem Intravasalraum. Die Basalmembran bildet neben den Endothelzellen eine zweite strukturelle Barriere gegen die Extravasation von zellulären Blutbestandteilen und verankert die Endothelzellen mit den Astrozyten über Integrine. Perizyten sind um die Basalmembran herum und teilweise in sie eingelagert. Fortsätze der perivaskulären Astrozyten bilden eine weitere Schicht. Eine intakte mikrovaskuläre Basalmembran und die über Integrine vermittelte Matrixadhäsion scheinen essentiell für die Zellfunktion zu sein (Yurchenco et Schittny, 1990; Hamann et al., 1999).

Während einer zerebralen Ischämie wird die strukturelle und funktionelle Integrität dieser endothelialen Barriere rasch ge- und später zerstört. Am Beginn dieser Schädigungskaskade steht die Schädigung der Endothelzellen und ihrer interendothelialen tight-junctions. (Huber et al., 2001). Die Barriere, die nach Untergang der Endothelzellen und der interendothelialen tight-junctions das Parenchym in dieser Situation vor den zellulären Blutbestandteilen und dem protein- und proteasenreichen Exsudat des Blutes schützt, ist die Basalmembran (del Zoppo et al., 1998). Die Basalmembran ist in die extrazelluläre Matrix eingebettet und enthält eine Lage aus Kollagen Typ IV und ein Netz aus Laminin, das mit Entaktin vernetzt ist (Yurchenco et Schittny, 1990; Erickson et Couchman, 2000, Siconofi et al., 2003). Nach Verlust der Endothelzellen ist es proteolytischen Enzymen, wie z.B. Matrix-Metallo-Proteinasen und Plasmin aus dem Blut möglich die Basalmembran anzugreifen und zu verdauen. Das Ergebnis dieses Verdauungsprozesses ist der Zusammenbruch der Basalmembran als funktionelle und strukturelle Barriere, so dass das Gehirnparenchym bloß liegt und dem Blut ausgesetzt ist. Mögliche Folgen könnten Hämorrhagien und hämorrhagische Transformationen sein (Hamann et al., 1999; del Zoppo et Hallenbeck, 2000).

Die Schädigung der Basalmembran durch eine Ischämie könnte sowohl von endogenen Plasminogenaktivatoren wie t-PA und u-PA, als auch von verschiedenen Matrix-Metallo-Proteasen wie MMP-2 und MMP-9 und/oder von einer Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten (PMN-Leukozyten) verursacht sein (del Zoppo et al. 1998).

Die Daten dieser Untersuchung legen den Verdacht nahe, dass eine milde bis moderate Hypothermie mit einer reduzierten Aktivität und Konzentration von endogenen Proteasen z.B. MMP-2 und MMP-9 und endogener Plasminogenaktivatoren wie u-PA und t-PA assoziiert ist. Verschiedene bisher durchgeführte Studien bringen die Degradation der

Endothelzellen und der Basalmembran bei einer zerebralen Ischämie mit den oben genannten Proteasen MMP-2, MMP-9, u-PA und t-PA in Verbindung (Hamann et al., 1998; Heo et al., 1999; Hosomi et al., 2001, Ito et al., 2000; Planas et al., 2001; Preston et Webster, 2004).

Endothelzellen selbst produzieren endogenes t-PA um eine Thrombose an der Gefäßwand zu verhindern (Lijnen et al., 1998). Eine gleichzeitige Aktivierung von u-PA konnte bei einer zerebralen Ischämie nachgewiesen werden (Hosomi et al., 2001). Ein fein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen dem Gerinnungssystem und dem fibrinolytischen System ist unabdingbar für die mikrovaskuläre Funktion und die Rheologie (del Zoppo 1988; del Zoppo, 1994). Neben seiner thrombolytischen Aktivität, die das Offenhalten und die Durchgängigkeit der Gefäße bewirkt, kann Plasmin extrazelluläre Matrixproteine hydrolysieren und MMP-9 aktivieren (del Zoppo, 1994; Dijkhuizen et al., 2001; Hosomi et al., 2001; Lijnen et al., 1998; Nagai et al., 1999; Pfefferkorn et Rosenberg, 2003). Das Verhältnis zwischen endogenen Inhibitoren und Aktivatoren zu ihren entsprechenden Proteasen entscheidet, ob es zu einem Abbau der extrazellulären Matrix kommt (Lapchak et al., 2000; Liotta et al., 1981; Rosenberg et Navratill, 1997; Lukes et al., 1999). Neben Plasmin sind auch die zwei Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 und MMP-9 bei diesem Prozeß beteiligt. MMP-2 und MMP-9 können ihrerseits selbst von Plasmin aktiviert werden. In einem Versuchsmodell mit permanenter zerebraler Ischämie ist bei MMP-bildenden Zellen (z.B. neutrophile Leukozyten, Endothelzellen und Makrophagen) die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 erhöht (Romanic et al., 1998). Die Protease MMP-2 wird konstitutiv exprimiert und ihre Aktivierung wird von einer membrangebundenen Metalloproteinase vermittelt. Die Aktivierung von MMP-2 katalysiert wiederum die Umwandlung und Aktivierung von pro-MMP zu MMP-9. In der Studie von Rosenberg et al. konnte schon in der dritten Stunde bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie aktiviertes MMP-9 nachgewiesen werden (Rosenberg et al., 2001). In früheren Untersuchungen konnten Rosenberg et al. einen Anstieg des MMP-Vorläufers pro-MMP-9 bei einer transienten zerebralen Ischämie zeigen (Rosenberg et al., 1998).

Mit dieser Studie konnte neben der Verminderung der Basalmembranschädigung zusätzlich gezeigt werden, dass eine postischämische Hypothermie sowohl die Aktivität von MMP-2 als auch von MMP-9 signifikant reduziert. Die Aktivitäten der Matrix-Metallo-Proteinasen wurden mit Hilfe von Zymographien (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)) gemessen. Der methodische Nachteil dieser Bestimmungsmethode liegt möglicherweise in dem Umstand, dass das SDS aus dem Gel auch inaktives pro-MMP zu aktivem MMP aktivieren kann. Es wäre möglich, dass die gemessene Aktivität der MMP-Gele eher die gesamte MMP-Konzentration als die wahre

Aktivität in vivo zeigt. Die Reduktion der proteolytischen Aktivität von MMP unter 100% des Ausgangswertes in der ischämischen Hemisphäre bei den hypothermen Tieren könnte eher ein früheres Aktivitätsniveau widerspiegeln. Als Erklärung für diese Verminderung der normalerweise verfügbaren proteolytischen Potenz im nichtischämischen Hirngewebe könnte ein, möglicherweise gesteigerter Verbrauch der proteolytischen Aktivität nach einer längeren Reperfusionphase sein.

Die später gemessene schwerere und ausgeprägtere proteolytische Aktivierung, wie sie bei den normothermen Kontrolltieren auftritt wird durch eine postischämische Hypothermie verhindert. Die Reduktion der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 könnte letztendlich den teilweise verminderten ischämischen Schaden an der Basalmembran nach einer postischämischen Hypothermie erklären.

In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine postischämische Hypothermie die Aktivierung des endogenen Plasminogens zu Plasmin durch endogene Plasminogenaktivatoren signifikant vermindert. Laut den Untersuchungen von Hosomi et al. spielt die starke Aktivierung von u-PA nach einer Ischämie eine Schlüsselrolle im Gehirn (Hosomi et al., 2001). Diese starke Aktivierung von u-PA wurde im Vergleich zu den normothermen Kontrollen, durch eine postischämische Hypothermie auf durchschnittlich 20% des Ausgangswertes reduziert. Die größte Reduktion von u-PA konnte eher in den Basalganglien als im Cortex gemessen werden. Dies könnte das gehäufte Auftreten von Hämorrhagien bzw. hämorrhagischen Komplikationen wie Blutungen besonders in den Basalganglien erklären (Kano et al., 2000).

In Übereinstimmung mit anderen Forschungsgruppen fanden wir die ausgeprägtesten Effekte bei der Expression von u-PA und MMP-9 (Corbett et al., 1997; Hosomi et al., 2001; Menshikov et al., 2002; Sumii et al., 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es möglich, dass eine postischämische Hypothermie die sekundäre Aktivierung von MMP-9 durch u-PA reduziert oder gar verhindert. Dieser Effekt könnte durch die Reduktion der hochregulierten u-PA-Aktivität bei einer Ischämie verursacht sein. Diese Reduktion der sekundären Aktivierung von MMP-9 durch u-PA würde den Verlust von Kollagen Typ IV in der Basalmembran vermindern oder gar verhindern und somit die Integrität und Funktion der Basalmembran erhalten.

4.3. Ausblicke

Obwohl die meisten Mechanismen der protektiven Effekte der Hypothermie bei einer zerebralen Ischämie ungeklärt bleiben, zeigen verschiedene Studien beim Menschen und im Tiermodell, dass eine postischämische Hypothermie die negativen Auswirkungen in Bezug auf Infarktgröße, Verlust der Integrität der Basalmembran und des neurologischen Outcomes einer zerebralen Ischämie signifikant verringern kann (Bernard et al., 2002; The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group; 2002; Hamann et al., 2004; Kawai et al., 2000; Yanamoto et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine milde bis moderate Hypothermie die mikrovaskuläre Basalmembran schützt, die Extravasation von korpuskulären Blutbestandteilen vermindert und das Infarktvolumen reduziert. Aus diesem Grund könnte bei einer akuten Ischämie durch einen thrombotischen Gefäßverschluß eine postischämische Hypothermie, den neurologischen Schaden und das Auftreten und die Schwere einer Hämorrhagie bei einer thrombolytischen Therapie (Lyse-Therapie) reduzieren. Eine postischämische Hypothermie könnte in Verbindung mit einer Lyse-Therapie das Hämorrhagierisiko vermindern und das heikle Risiko-Nutzen-Verhältnis der Thrombolyse verbessern. Damit ließe sich bei der Thrombolyse ein aggressiveres Vorgehen oder eine Ausweitung des Zeitfensters ermöglichen, um den zerebralen Blutfluß wiederherzustellen und den neuronalen Schaden zu begrenzen.

5. Zusammenfassung

Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass es beim Schlaganfall in der Reperfusionphase zu einer Schädigung der Basalmembran und zu einem Zusammenbruch der mikrovaskulären Integrität kommt. Dies kann zu einer intrazerebralen Hämorrhagie mit zusätzlichen neurologischen Schäden führen. Die systemische Thrombolyse mit rekombinatem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (rt-PA) zielt auf die Fibrinolyse des Thrombus, der das Hirngefäß verschließt, um den zerebralen Blutfluß wiederherzustellen und den Infarkt zu verkleinern. Jedoch haben klinische Studien gezeigt, dass die Thrombolyse die Gefahr einer intrazerebralen Blutung steigert. Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass eine postischämische Hypothermie das Infarktvolume verkleinern kann. Der postulierte Wirkungsmechanismus einer Hypothermie ist die Verminderung der Aktivität unspezifischer und spezifischer proteolytischer Systeme (z.B. endogene Plasminogenaktivatoren (u-PA und t-PA) oder die Matrix-Metallo-Proteinase MMP-2 und MMP-9).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß einer postischämischen Hypothermie auf die Basalmembran der Hirngefäße nach einer zerebralen Ischämie mit Reperfusion zu untersuchen und mögliche Schädigungsmechanismen darzulegen.

Hierzu wurde bei narkotisierten, beatmeten Ratten eine 3-stündige transiente fokale zerebrale Ischämie mit 24-stündiger Reperfusion erzeugt. Postischämisch wurde durch extrakorporale Kühlung eine 24-stündige milde bis moderate Hypothermie erzeugt und mittels Temperatursonde ständig gemessen und überwacht. Nach Beendigung des Versuches wurden die Hirne entnommen und einer volumetrischen, immunohistochemischen und biochemischen Aufarbeitung und Auswertung zugeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine postischämische Hypothermie die Degradation der Basalmembran zum großen Teil verhindert und die Infarktgröße signifikant reduziert. Gleichzeitig kommt es durch diesen strukturellen Erhalt der Basalmembran zu einem funktionellen Erhalt der Integrität und zu einer Verminderung der Extravasation von korpuskulären und nichtkorpuskulären Blutbestandteilen. Zusätzlich konnte eine mögliche Ursache für die Degradation der Basalmembran und den Verlust der mikrovaskulären Integrität aufgezeigt werden. Die postischämische Hypothermiebehandlung verhinderte die Steigerung der Aktivität der Plasminogen-Aktivatoren u-PA und t-PA und der Matrix-Metallo-Proteinase MMP-2 und MMP-9.

Wir schließen aus den vorliegenden Untersuchungen, dass eine postischämische Hypothermie das Risiko des Auftretens einer Hämorrhagie als gefürchtete Komplikation nach einer zerebralen Ischämie senken kann. Dies gewinnt zusätzlich an Bedeutung, da die therapeutische Anwendung der systemischen Thrombolyse die Gefahr des Auftretens

einer Hämorrhagie steigert. Eine systemische Thrombolyse in Kombination mit einer Hypothermie wäre eine mögliche Therapieoption, um die Gefahr des Auftretens einer intrazerebralen Blutung zu vermindern. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand unklar. Deshalb sind vor der Anwendung beim Menschen noch weitere experimentelle und klinische Studien notwendig.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Ahn MY, Zhang ZG, Tsang W, Chopp M (1999)
Endogenous plasminogen activator expression after embolic focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 837: 169-176
- 2) Asahi M, Asahi K, Jung J-C, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000)
Role of matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: Effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb. Blood Flow Metab* 20: 1681-1689
- 3) Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996)
Quantitative evaluation of blood brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 739: 88-96
- 4) Blasi F, Vassalli JD, Dano K (1987)
Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104: 801-804
- 5) Bernard SA, Gray TW, Buist MD (2002)
Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 346: 557-563
- 6) Bruijn JA, Hogendoorn PCW, Hoedemaeker PJ, Fleuren GJ (1988)
The extracellular matrix in pathology. *J Lab Clin Med* 111: 140-149
- 7) Burggraf D, Martens KH, Jäger G, Hamann GF (2003)
Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia. *Thromb Haemost.* 89: 1072-1080
- 8) Busto R, Globus MY-T, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg (1989)
Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20: 904-910
- 9) Colbourne F, Corbett D, Zhao Z, Yang J, Buchan AM (2000)
Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20: 1702-1708
- 10) Corbett D, Nurse S, Colbourne F (1997)
Hypothermic neuroprotection. A global ischemia study using 18- to 20-month-old gerbils. *Stroke* 28: 2238-2242
- 11) Correia M, Silva M, Veloso M (2000)
Cooling therapy for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2: CD001247
- 12) De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, Devlin TG, Jausse M, Davis SM, Koroshetz WJ, Rordorf G, Warach S (2004)
Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 63: 312-317
- 13) Del Zoppo GJ (1988)
Thrombolytic therapy in cerebrovascular disease. *Stroke* 19: 1174-1179

- 14) Del Zoppo GJ (1994)
Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 6: 47-96
- 15) Del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF (1998)
Ischemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 1-9
- 16) Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM (2000)
Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res.* 98: 73-81
- 17) Deutsche Schlaganfall Stiftung (1999)
Epidemiologische Daten
- 18) Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH (2002)
Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke* 33: 2100-2104
- 19) Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M (2001)
Combination of decompressive craniotomy and mild hypothermia ameliorates infarct volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke* 32: 2675- 2681
- 20) Erickson AC, Couchman JR (2000)
Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem.* 48: 1291-1306
- 21) European Cooperative Acute Stroke Study (1995)
Hacke W, Kaste M, Fieschi C et al.
Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)
JAMA 274; 1017.25
- 22) Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH (1999)
Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 842: 92-100
- 23) Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH (1999)
Early appearance of activated metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: A possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 1020-1028
- 24) Ginsberg MD, Sternau LL, Globus YT (1992)
Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cereb Brain Metab Rev* 4: 189-225
- 25) Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD (1995)
Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem* 65: 1250-1256
- 26) Granger HJ, Yuan Y, Zawieja DC (1995)
Ultrastructural basis of leukocyte migration through the microvascular membrane. In: *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion* (Granger DN, Schmid-Schönbein GW, eds), New York, Oxford University Press, pp 187-189

- 27) Gregoire N (1989)
The blood-brain barrier. *J Neuroradiol* 16: 238-250
- 28) Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M, Hamann GF (2005)
Recombinant tissue plasminogen aktivator attenuates basal lamina antigen loss after experimentell focal cerebral ischemia *Neurol. Res.* 27(2): 212-7
- 29) Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ (1996)
Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1373-1378
- 30) Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ (1995)
Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26: 2120-2126
- 31) Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R (1999)
Hemorrhagic transformation of cerebral infarction: possible mechanisms. *Thromb Haemost.* 82 (suppl): 92-94
- 32) Hamann GF, Liebetrau M, Martens HK (2002)
Microvascular basal lamina injury following experimental focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 526-533
- 33) Hamann GF, Liebetrau M, Martens KH, Burggraf D, Kloss CUA, Bültemeier G, Wunderlich N, Jäger G, Pfefferkorn T (2002)
Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 526-533
- 34) Hamann GF (2003)
Unriddling the role of matrix metalloproteinases in human cerebral stroke. *Stroke* 34: 40-46
- 35) Heck LW, Blackburn WD, Irwin MH, Abrahamson DR (1990)
Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G. *Am J Pathol* 136: 1267-1274
- 36) Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999)
Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 624-633
- 37) Heussen C, Dowdle EB (1980)
Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 102: 196-202
- 38) Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (2001)
Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32: 1341-1348
- 39) Hossmann KA (1997)
Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock Vol* 8 No 2; pp 95-101
- 40) Huber JD, Egleton RD, Davis TP (2001)
Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 24: 719-725

- 41) Ishikawa M, Sekizuka E, Sato S, Yamaguchi N, Inamasu J, Bertalanffy H, Kawase T, Iadecola C (1999)
Effects of moderate hypothermia on leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 30: 1679-1686
- 42) Ito T, Takenaka K, Sakai H, Yoshimura S, Hayashi K, Noda S, Sakai N (2000)
Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Res.* 22: 413-419
- 43) Kano T, Katayama Y, Tejima E, Lo EH (2000)
Hemorrhagic transformation after fibrinolytic therapy with tissue plasminogen activator in a rat thromboembolic model of stroke. *Brain Res.* 854: 245-248
- 44) Kawai N, Okauchi M, Morisaki K, Nagao S (2000)
Effects of delayed intraischemic and postischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31: 1982-1999
- 45) Kloss CU, Thomassen N, Fesl G, Yousri TA, Hamann GF (2002)
Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol. Res.* 24: 713-718
- 46) Koizumi J, Nakazawa T, Yoshida Y (1985)
Reperusable brain infarction model in the rat (abstract). *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japan, April 18-19, 1985, p 159*
- 47) Kollmar R, Schabitz WR, Heiland S, Georgiadis D, Schellinger PD, Bardutzky J, Schwab S (2002)
Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia: an MRI study. *Stroke* 33: 1899-1904
- 48) Krieger DW, De Georgia MA, Abou-Chebl A (2001)
Cooling for acute ischemic brain damage (COOL AID): an open pilot study of induced hypothermia in acute ischemic stroke. *Stroke* 32: 1847-1854
- 49) Laas R, Igloffstein J, Meyerhoff (1983)
Cerebral infarction due to carotid occlusion and carbon monoxide exposure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46; 756-773
- 50) Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA (2000)
Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator) – induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 31: 3034-3040
- 51) Laptook AR, Corbett RJ, Sterett R, Burns DK, Garcia D, Tollefsbol G (1997)
Modest Hypothermia provides partial neuroprotection when used for immediate resuscitation after brain ischemia. *Pediatr Res* 42: 17-23
- 52) Liebetrau M, Burggraf D, Martens HK, Pichler M, Hamann GF (2004)
Delayed moderate hypothermia reduces calpain activity and breakdown of its substrate in experimental focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 357: 17-20

- 53) Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D (1998)
Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1035-1045
- 54) Liotta LA, Goldfarb RH, Terranova VP (1981)
Cleavage of laminin by thrombin and plasmin: alpha thrombin selectively cleaves the beta chain of laminin. *Thromb Res.* 21: 663-673
- 55) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989)
Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- 56) Loy M, Burggraf D, Martens KH, Liebetrau M, Wunderlich N, Bültmeier G, Nemori R, Hamann GF (2002)
A gelatine in situ-overlay technique localizes brain matrix metalloproteinase activity in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 116(2): 125-33
- 57) Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M (1999)
Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol.* 19: 267-284
- 58) Maier CM, Ahern vKB, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK (1998)
Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia. *Stroke* 29: 2171-2180
- 59) Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH (1980)
Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J Biol Chem* 255: 5435-5441
- 60) Martinez-Hernandez A, Amenta PS (1983)
The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48: 656-677
- 61) McManus T, Sadgrove M, Pringle AK, Chad JE, Sundstrom LE (2004)
Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischemic insults in cultured hippocampal slices. *J Neurochem* 91: 327-336
- 62) Meng W, Wang X, Asahi M, Kano T, Asahi K, Ackerman RH, Lo EH (1999)
Effects of tissue type plasminogen activator in embolic versus mechanical models of focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1316-1321
- 63) Menshikov M, Elizarova E, Plakida K (2002)
Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes in gene transcription and protein synthesis. *Biochem J; epub 12 Jul; 10.1042/BJ20020663*
- 64) Mohan PS, Schittny JC (1990)
Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590
- 65) Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U et al. (1987)
Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leukocytes. *Biochem J* 162: 195-7

- 66) Nagai N, Vanlinthout I, Collen D (1999)
Comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, and staphylokinase on cerebral ischemic infarction and pulmonary clot lysis in hamster models. *Circulation* 100: 2541-2546
- 67) Nagase H (1997)
Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378: 151-160
- 68) National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995)
Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N engl J Med* 333: 1581-1587
- 69) Paxinos G, Watson C (1998)
The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *San Diego, Calif: Academic Press; 1998*
- 70) Peters A, Palay BL, Webster HD (1991)
The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells. 3rd ed. *New York, Oxford University Press, p 352-353*
- 71) Petty MA, Wettstein JG (2001)
Elements of cerebral microvascular ischemia. *Brain Res Rev.* 36: 23-43
- 72) Pfefferkorn T, Staufer B, Liebetrau M, Bültemeier G, Vosko MR, Zimmermann C, Hamann GF (2000)
Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flood Metab* 20: 337-342
- 73) Pfefferkorn T, Rosenberg GA (2003)
Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rt-PA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34: 2025-2030
- 74) Pike MC, Wicha MS, Yoon P et al. (1989)
Laminin promotes the oxidative burst in human neutrophils via increased chemoattractant receptor expression. *J Immunol* 142: 2004-11
- 75) Planas AM, Sole S, Justicia C (2001)
Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8: 834-846
- 76) Ponnampalam SN, Mayberg MR (2004)
Mediators of blood-brain barrier disruption and potential therapeutic interventions for protection of the barrier following focal ischemia. *Clin Neurosurg* 51: 112-119
- 77) Prado R, Watson BD, Zhao W, Yao H, Busto R, Dietrich WD, Ginsberg MD (1996)
L-arginine does not improve cortical perfusion or histopathological outcome in spontaneously hypertensive rats subjected to distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 612-622
- 78) Preston E, Webster J (2004)
A two-hour window for hypothermic modulation of early events that impact delayed opening of the rat blood-brain barrier after ischemia. *Acta Neuropathol* 108: 406-412

- 79) Rijken DC (1995)
Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin. Haematol.* 8: 291-312
- 80) Risau W, Hallmann R, Albrecht U et al. (1986)
Brain astrocytes induce the expression of an early cell surface marker for the blood-brain-barrier specific endothelium. *EMBO J* 5: 3179-3183
- 81) Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998)
Matrix Metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29: 1020-1030
- 82) Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996)
Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16: 360-366
- 83) Rosenberg GA, Navratil M (1997)
Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 48: 921-926
- 84) Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE (1998)
Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29: 2189-2195
- 85) Rosenberg GA (1999)
Ischemic brain edema. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 42: 209-216
- 86) Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J (2001)
Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res.* 893: 104-112
- 87) Roy MK, Ray A (2004)
Effect of body temperature on mortality of acute stroke. *J Assoc Physicians India* 52: 959-961
- 88) Siconolfi LB, Seeds NW (2003)
Mice lacking tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator genes show attenuated matrix metalloproteinases activity after sciatic nerve crush *J Neurosci Res.* 74: 430-434
- 89) Scholler K, Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R (2004)
Neuroprotection in ischemic stroke—combination drug therapy and mild hypothermia in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1023: 272-278
- 90) Schreiber SS, Tan Z, Sun N, Wang L, Zlokovic BV (1998)
Immunohistochemical localisation of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery* 43: 909-913
- 91) Sporer B, Martens KH, Ködel U, Haberl RL (1997)
L-Arginine-induced regional cerebral blood flow increase is abolished after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 1074-1080
- 92) Sumii T, Lo EH (2002)
Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33: 831-836

- 93) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995)
Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 333: 1581-1587
- 94) The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group (2002)
Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 346: 549-556
- 95) Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Sorano SG, Lipton SA (1998)
Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA-deficient mice. *Nat. Med.* 4: 228-231
- 96) Watanabe H, Hattori S, Katsuda S et al. (1990)
Human neutrophil elastase: degradation of basement membrane components and immunolocalisation in the tissue. *J Biochem* 108: 753-9
- 97) Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, Tohnai N, Zhang Z, Kikuchi H (1999)
Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke* 30: 2720-2726
- 98) Yanamoto H, Nagata I, Nijitsu Y, Zhang Z, Xue JH, Sakai N, Kikuchi H (2001)
Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke* 32: 232-239
- 99) Yang GY, Betz AL (1994)
Reperfusion-induced injury to the blood brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25: 1658-1664
- 100) Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA (2000)
Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* 96: 569-576
- 101) Yurchenco PD, Schittny JC (1990)
Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4: 1577-1590
- 102) Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Goussev A, Powers C, Ho KL, Morris D, Smyth SS, Coller BS, Chopp M (2001)
Dynamic platelet accumulation at the site of the occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels is associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 912: 181-194

7. Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wäre ohne eine exzellente Betreuung, Anregung, Hilfe und Unterstützung der folgenden Personen nicht möglich gewesen.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor Dr. Gerhard F. Hamann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit in seinem Neurovaskulärem Labor an der Neurologischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen und für die exzellente Betreuung, Förderung und Motivation, die ich in all den Jahren hinweg von ihm erhalten habe.

Desweiteren bedanke ich mich bei meinen Freunden und Kollegen Frau Dr. rer. nat. Dorothe Burggraf, Herrn PD Dr. med. Dr. med. habil. Uwe Ködel, Herrn Dipl. biol. Andreas Trinkl und Herrn PhD Dr. med. Milan Vosko für die hilfreiche Unterstützung und die wertvollen Anregungen, die mir jederzeit und uneingeschränkt zur Verfügung standen.

Besonderen Dank schulde ich auch Frau MTA Gabriele Jäger und Frau MTA Nathalie Wunderlich für das Schneiden, Färben und Digitalisieren der Hirne und die Aufbereitung und Durchführung der gesamten Biochemie.

Ganz besonderen Dank schulde ich meiner Familie, meinem Vater Herrn Dipl. Ing. Klaus W. Martens, dem diese Arbeit gewidmet ist, meiner Mutter Frau Helga Inge Martens, meiner Schwester Frau RA E. Dominique Martens, meinen Schwiegereltern Frau Inge Rogall und Herrn Dr. med. Hartmut Rogall und meinen Schwägerinnen Frau RA Kathrin Rogall und Caroline Rogall.

Ganz besonderer und inniger Dank gebührt meiner Frau, Frau Dr. med. Christina Martens-Rogall und unserem Sohn Nikolaus Luca Martens.

8. Lebenslauf

Name:	Dr. med. Klaus Helge Martens
Geburtsdatum:	08.07.1966
Geburtsort:	München
Schulbildung:	
09/1973-07/1977	Grundschule an der Parkstraße, Eichenau
09/1977-06/1987	Max-Planck-Gymnasium München-Pasing
Wehrdienst:	
10/1987-12/1988	Marineversorgungsschule List/Sylt Bundeswehrkrankenhaus München
Hochschulbildung:	
<i>Studium der Humanmedizin</i>	
05/1989-05/1991	Vorklinik Ludwig-Maximilians-Universität München
05/1991-07/1993	Beurlaubung wegen Regelung des Nachlasses meines Vaters Dipl. Ing. Klaus W. Martens
09/1993-04/1998	Klinik Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>Studium der Zahnmedizin</i>	
10/2000-03/2004	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinische Tätigkeit:	
05/1998-10/1999	AiP in der Neurologischen Klinik des Klinikum München-Großhadern in München (Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Brandt, FRCP)
01/2000-03/2000	Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Neurovaskulärem Labor unter Prof. Dr. G. F. Hamann in der Neurologischen Klinik des Klinikums München-Großhadern (Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Brandt, FRCP)
04/2000-11/2000	Stationsarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsspital Balgrist, Zürich/Schweiz (Prof. Dr. V. Dietz)

- 12/2000-05/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Neurovaskulärem Labor
(Prof. Dr. G. F. Hamann) in der Neurologischen Klinik des
Klinikums München-Großhadern
(Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Brandt, FRCP)
- 05/2004-03/2006 Arzt und Zahnarzt an der Klinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie des Klinikums Bremen-Mitte in Bremen
(Prof. Dr. Dr. A. Bremerich)
- ab 04/2006 Arzt und Zahnarzt an der Klinik für Kiefer- und
Gesichtschirurgie des Katharinenhospitals in Stuttgart
(Prof. Dr. Dr. D. Weingart)