

**Die Mediatorfunktion von
Bradykinin und Platelet-Activating Factor
bei der globalen zerebralen Ischämie**

Jens Matthias Lehmberg

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

Die Mediatorfunktion von Bradykinin und Platelet-Activating
Factor bei der globalen zerebralen Ischämie

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

vorgelegt von
Jens Matthias Lehmberg

aus
Mönchengladbach

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
Priv. Doz. Dr. M. Dichgans

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Zahler
Prof. Dr. H. Schad

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. E. Uhl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2002

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Methodik	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Experimentelles Modell	12
2.2.1	Anästhesie	12
2.2.2	Arterieller und venöser Zugang	12
2.2.3	Temperatur	13
2.2.4	Umschlingung der Halsschlagadern	13
2.2.5	Transdurales Schädelfenster	13
2.2.6	Kontrastverstärkung des Plasmas	14
2.2.7	In vivo Markierung der Leukozyten mit Rhodamin 6G	14
2.2.8	Prüfung der Blut-Hirnschranken-Integrität	14
2.2.9	Intravitalmikroskopie	15
2.2.10	Mikroskopierareal	17
2.2.11	Quantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie	17
2.2.11.1	Gefäßdurchmesser	18
2.2.11.2	Kapillardichte	19
2.2.11.3	Rollen von Leukozyten	19
2.2.11.4	Adhärenz von Leukozyten	20
2.2.11.5	Arterio-venöse Transitzeit	20
2.2.12	Globale zerebrale Ischämie	24
2.2.13	Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht	24
2.2.14	Histologie	26
2.2.15	Versuchsprotokoll	27
2.2.16	Histomorphometrie	27
2.2.17	Osmotische Minipumpe	31
2.3	PAF-Rezeptorantagonist WEB 2170	31
2.4	Bradykinin B1-Rezeptorantagonist B 9858	32

2.5	Bradykinin B2-Rezeptorantagonist CP 0597	34
2.6	Bradykinin B1/B2-Rezeptorantagonist B 9430	35
2.7	Versuchsgruppen	36
2.8	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Platelet-activating factor	38
3.1.1	Niedrigdosis	38
3.1.1.1	Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur	38
3.1.1.2	Gefäßdurchmesser	38
3.1.1.3	Leukozyten-Endothelinteraktionen	40
3.1.1.4	Mikrovaskuläre Durchblutung	42
3.1.1.5	Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht	43
3.1.1.6	Histomorphometrie	44
3.1.2	Hochdosis	45
3.1.2.1	Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur	45
3.1.2.2	Gefäßdurchmesser	46
3.1.2.3	Leukozyten-Endothelinteraktionen	48
3.1.2.4	Funktionelle Kapillardichte	50
3.1.2.5	Mikrovaskuläre Durchblutung	51
3.1.2.6	Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht	52
3.1.2.7	Histomorphometrie	55
3.2	Bradykinin	56
3.2.1	Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur	57
3.2.2	Gefäßdurchmesser	58
3.2.3	Leukozyten-Endothelinteraktionen	60
3.2.4	Funktionelle Kapillardichte	62
3.2.5	Mikrovaskuläre Durchblutung	63
3.2.6	Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht	64
3.2.7	Histomorphometrie	68
3.3	Intravitalmikroskopische Aufnahmen	70

3.4	Elektronenmikroskopie	73
4	Diskussion	78
4.1	Experimentelles Modell	78
4.1.1	Verwendung eines Tiermodells	78
4.1.2	Auswahl des Versuchstieres	78
4.1.3	Modell der globalen zerebralen Ischämie	81
4.1.4	Dauer der Ischämie	84
4.1.5	Anästhesie	84
4.2	Untersuchung der Mikrozirkulation	86
4.2.1	Leukozyten-Endothelinteraktionen	91
4.2.2	Funktionelle Kapillardichte	94
4.2.3	Mikrovaskuläre Durchblutung	97
4.3	Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht	98
4.4	Histomorphometrie	100
4.5	Platelet-activating factor	101
4.5.1	PAF im zentralen Nervensystem	101
4.5.2	Platelet-activating factor bei zerebraler Ischämie	103
4.5.3	Gefäßdurchmesser	104
4.5.4	Leukozyten-Endothelinteraktionen	105
4.5.5	Funktionelle Kapillardichte	106
4.5.6	Mikrovaskuläre Durchblutung	107
4.5.7	Neurologisches Defizit und Überleben	108
4.5.8	Histomorphometrie	109
4.6	Bradykinin	111
4.6.1	Bradykinin im zentralen Nervensystem	111
4.6.2	Gefäßdurchmesser	114
4.6.3	Leukozyten-Endothelinteraktionen	116
4.6.4	Funktionelle Kapillardichte	120
4.6.5	Mikrovaskuläre Durchblutung	120
4.6.6	Neurologisches Defizit und Überleben	121

4.6.7	Histomorphometrie	123
5	Zusammenfassung	124
6	Literaturliste	127
7	Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	159
8	Danksagung	160
9	Lebenslauf	162

1 Einleitung

Zerebrale Ischämie bedeutet Verringerung der Blutversorgung des Gehirnes unterhalb einen kritischen Wert. In Abhängigkeit von Dauer und Ausmaß der Durchblutungsstörung kommt es zum transitorischen Funktionsausfall bis hin zur irreversiblen Schädigung des Gehirns mit einem Spektrum, das vom Untergang einzelner Neurone in selektiv vulnerablen Hirnarealen bis zur Ausbildung von Pannekrosen des Parenchyms – der ischämischen Infarzierung – reichen kann. Der Untergang von Hirngewebe hat meistens einen Funktionsausfall zur Folge, der sich in neurologischen und psychologischen Defiziten äußert.

Eine Reihe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems können zur zerebralen Ischämie führen. Dem Schlaganfall liegt in 85% der Fälle eine fokale zerebrale Ischämie zugrunde, die durch einen embolischen oder thrombotischen Verschluss von Hirnarterien verursacht wird. Einen gewissen Anteil haben hier auch Verlegungen von Hirnvenen und der großen Blutleiter (Sinus), die zum hirnvenösen Infarkt führen. Er ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland 1998). Eine globale zerebrale Ischämie tritt u.a. auf bei Kreislaufstillstand als Folge von Herzversagen, Beinahe-Ertrinken, Vergiftung mit Kohlenstoffmonoxyd, massiver Hämorrhagie und auch bei der extrakorporalen Perfusion mit Einsatz der Herz-Lungenmaschine. Die stark verminderte Pumpleistung des Herzens im Rahmen einer schweren Herzinsuffizienz oder nach Herzbeutelamponade, bei Hindernissen in der kardialen Ausstrombahn z. B. durch Herzklappenfehler genauso wie im Rahmen der Kreislaufdysregulation mit vermindertem venösen Rückstrom zum Herzen mit drastischem Absinken der Auswurfleistung und resultierender arterieller Hypotension kann bei kritischem Absinken unter die untere Schwelle der zerebrovaskulären Autoregulation zur Ischämie des Gehirns führen. Das Ausmaß der neurologischen Schädigung durch eine globale zerebrale Ischämie beim Menschen verdeutlicht eine Untersuchung von Longstreth et al. aus dem Jahr 1983. Er hat damals über 459 überlebende Patienten nach Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Wiederbelebung berichtet. Von diesen Patienten verblieben 180 im Koma. Von 279 Patienten mit Wiederkehr des Bewusstseins hatten 59 kognitive Defizite und 32 hatten

eine Kombination von motorischen und kognitiven Defiziten (Longstreth et al. 1983).

Sowohl die Häufigkeit von Erkrankungen, die mit einer zerebralen Ischämie einhergehen, als auch deren verheerende Folgen verpflichten weiterhin zu größten Anstrengungen, das pathophysiologische Verständnis der zerebralen Ischämie zu verbessern, als Grundlage der Entwicklung und Erprobung wirksamer therapeutischer Methoden.

Eine Reifung (“maturation phenomenon”) des ischämischen Schadens im Laufe der ersten Stunden und Tage nach einem ischämischen Insult ist erstmals von Ito et al. beschrieben worden (Ito et al. 1975). Dieses Konzept beinhaltet, dass der ischämische Schaden des Hirnparenchyms sofort nach dem Insult noch nicht endgültig ist, sondern sein Maximum erst nach Stunden und Tagen erreicht. An der endgültigen Reifung der irreversiblen Parenchym- bzw. Zellschädigung sind die Mechanismen des sekundären Hirnschadens beteiligt, deren Aufklärung bis hin zur molekularen Ebene nach wie vor im Mittelpunkt der Ischämieforschung steht. Die Bedeutung des sekundären Hirnschadens ist auch beim Schädel-Hirntrauma, der Subarachnoidalblutung und anderen Erkrankungen des ZNS anerkannt. Eine Vielzahl von komplizierten pathophysiologischen Vorgängen wird für den sekundären Hirnschaden verantwortlich gemacht. Dabei werden extrakraniell-systemische von intrakraniellen Prozessen differenziert. Extrakranielle Mechanismen sind eine arterielle Hypoxie und Hypotension, die Hyperthermie oder Infektionen. Als intrakranielle Mechanismen werden u.a. Störungen des Energiehaushalts des ischämischen Parenchyms angesehen, insbesondere der Abfall der ATP-Konzentration. Daraus resultiert eine Erhöhung der Laktatkonzentration mit dadurch hervorgerufener Gewebsazidose und ein Verlust der Zell- Ca^{2+} -Homöostase (Siesjö et al. 1996). Ist die Ischämie nur von kurzer Dauer, sind diese Störungen reversibel. Doch selbst kurze Ischämieepisoden können Prozesse in selektiv vulnerablen Hirnregionen in Gang zu setzen, die nach wenigen Tagen zur Nekrose oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. D.h. selbst wenn die postischämische Reperfusion des Gehirns eine normale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet, kann es zur weiteren Zunahme des ischämischen Gewebes Schadens kommen. Die pathophysiologischen Mechanismen des sekundären Hirnschadens sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Viele Ergebnisse belegen jedoch, dass Störungen der Mikrozirkulation und die Aktivierung von

Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen (del Zoppo 1994, del Zoppo et al. 1997, Feuerstein et al. 1994, Feuerstein et al. 1998, Hallenbeck 1996, Jean et al. 1998, Siesjö et al. 1996).

Viele experimentelle und klinische Beobachtungen sprechen dafür, dass die Aktivierung von Leukozyten eine pathophysiologische Funktion für den sekundären Gewebeschaden bei zahlreichen Erkrankungen hat. Als Beispiele gelten der Myokardinfarkt, der Schock, die Organtransplantation, die Arteriosklerose, das Adult respiratory distress syndrome, die diabetische Retinopathie, intestinale Ulcera, das Neurotrauma und der ischämische Schlaganfall (Schmid-Schönbein und Granger, 1995). Die Hemmung der Induktion von Leukozyten-Endothelinteraktionen durch Antikörper oder pharmakologische Inhibitoren unter experimentellen Bedingungen bei der transitorischen fokalen zerebralen Ischämie gewährleistet Protektion z.B. Verringerung des ischämischen Gewebeschadens (Chen et al. 1994, Chopp et al. 1996, Matsuo et al. 1994b, Mori et al. 1992, Shiga et al. 1992, Takeshima et al. 1992, Zhang et al. 1994). Experimentelle Untersuchungen der permanenten fokalen und der globalen zerebralen Ischämie mit Blockade der Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand haben hingegen widersprüchliche Befunde ergeben (Aspey et al. 1989, Bednar et al. 1991, Chopp et al. 1994, Clark et al. 1991, Dutka et al. 1989, Heinel et al. 1994, Schürer et al. 1991, Vasthare et al. 1990, Zhang et al. 1995). Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen eindringlich, dass die pathologische Funktion der Leukozytenaktivierung beim sekundären Hirnschaden nach einer Ischämie keineswegs geklärt ist.

Entsprechende Überlegungen gelten auch für die Störungen der zerebralen Mikrozirkulation unter diesen Bedingungen. Bereits 1968 haben Ames et al. das "no-reflow phenomenon" als Fehlen der Gewebedurchblutung auf der Ebene der Mikrozirkulation nach Beendigung der experimentellen Ischämiephase beschrieben (Ames et al. 1968). Sie machten dafür die Verlegung von Kapillaren mit Erythrozyten verantwortlich. Hingegen wiesen spätere Beobachtungen eher auf eine Verlegung durch Leukozyten hin (Fischer et al. 1977). Dies könnte nicht nur zum mechanisch bedingten lokalen Ausfall der Perfusion führen. Vielmehr könnten Leukozyten durch die Ausschüttung von entsprechenden Mediatoren eine Vasokonstriktion hervorrufen und

damit Ursache für die postischämisch verzögerte Hypoperfusion sein (Akopov et al. 1994, Lopez et al. 1989). Des Weiteren konnte vielfach gezeigt werden, dass Leukozyten in der Reperfusionphase nach einer zerebralen Ischämie emigrieren und im Hirnparenchym akkumulieren (Hallenbeck et al. 1986). Über ihre Phagozytosefunktion im Rahmen der Abräumung von nekrotischem Gewebe hinausgehend können aktivierte Leukozyten intakte Neurone und Gliazellen durch Freisetzung freier Sauerstoffradikale, hypochloriger Säure und proteolytischer Enzyme (z.B. Elastase, Kollagenase) schädigen (Weiss 1989, Welbourn et al. 1991, Matsuo et al. 1995, Schmid-Schönbein 1987).

Grundlage der Emigration von Leukozyten ist die Induktion einer Kaskade, wobei Leukozyten-Endothelinteraktionen am Anfang stehen. Bei der Margination, bei der der Leukozyt den Zentralstrom der postkapillären Venole zufällig verlässt, kommt der Leukozyt in Kontakt mit dem Endothel. Selektine vermitteln dann das Rollen von weißen Blutzellen am Gefäßendothel. Nun können unterschiedliche Chemokine wechselseitig auf Endothel und Leukozyt einwirken. Dies sind unter anderem Platelet-activating factor (PAF) (Camussi et al. 1981 und Zimmerman et al. 1996), Interleukin 8 (Huber et al. 1991 und Rot 1992), Leukotrien B₄ (Dorovini Zis et al. 1992) und Bradykinin (Ahluwalia et al. 1996). Die Bindung dieser Liganden an die jeweiligen Rezeptoren führt zu einer Konformationsänderung von Membranmolekülen der Leukozyten, die als Integrine an Moleküle der Ig-Superfamilie (ICAM-1 und -2, VCAM-1) auf der Endothelmembran binden können (Springer 1990 und Swerlick et al. 1992). Dies bewirkt die feste Adhärenz des Leukozyten am Endothel. Der nächste Schritt ist die Emigration der Zellen durch das Endothel in das Hirnparenchym einem chemotaktischen Gradienten folgend (Schall 1991).

Das Gefäßendothel zeigt eine große Heterogenität in Abhängigkeit vom Gefäßtypus und -segment (Arterie, Arteriole, Kapillare, Venole und Vene). Das Organ und die Spezies, in der das Gefäß lokalisiert ist, haben ebenfalls einen Einfluss (Zetter 1988). *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen auch in zerebralen Venolen durch Adhäsionsmoleküle und Entzündungsmediatoren vermittelt werden (Dorovini Zis et al. 1992). Bei der zerebralen Ischämie ist eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel des Gehirns histologisch nachgewiesen worden (Suzuki et al. 1998, Suzuki et al. 1997, Zhang et al. 1998 und Zhang

et al. 1995). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, welche Adhäsionsmoleküle und Mediatoren bei der zerebralen Ischämie an Leukozyten- Endothelinteraktionen *in vivo* beteiligt sind. Als potenzielle Kandidaten sind u.a. PAF und Bradykinin zu nennen.

Platelet-activating factor akkumuliert nach einer Ischämie im Rückenmark von Kaninchen (Lindsberg et al. 1990) sowie im Hirngewebe von Gerbils (Francescangeli et al. 1996b). Kultivierte Endothelzellen produzieren PAF nach Exposition mit Bradykinin oder Kalzium-Ionophoren (Satoh et al. 1996 und Satoh et al. 1995). Uhl und Mitarbeiter haben Leukozyten-Endothelinteraktionen in zerebralen Gefäßen durch Infusion von PAF hervorgerufen. Das Phänomen konnte mit einem spezifischen PAF-Antagonisten gehemmt werden (Uhl et al. 1999a). PAF selbst führt aber nicht nur zur funktionellen Hochregulation von Integrinen (s. o.), sondern bewirkt auch eine Externalisierung von Weibel-Palade Körpern (Lorant et al. 1991). Diese speichern P-Selektin, das innerhalb von Minuten nach Stimulus seine adhäsive Wirkung auf der Endothelzellmembran entfalten kann. Die vielseitigen pathophysiologischen Wirkungen von PAF auf die zerebrale Mikrozirkulation und dessen Beteiligung an proinflammatorischen Regelkreisen sprechen dafür, dass PAF ein Schlüsselmolekül des sekundären Hirnschadens ist (Frerichs und Feuerstein 1990). Ein wichtiges Indiz dafür ist außerdem, dass die Antagonisierung von PAF bei der globalen zerebralen Ischämie eine protektive Wirkung für das Überleben von selektiv vulnerablen Neuronen des Cornu ammonis im Hippocampus hat (Oberpichler et al. 1990).

Bradykinin und dessen Metabolit des-Arg⁹-Bradykinin sind die beiden wichtigsten Mediatoren des Kallikrein/Kininsystems; u.a. wirken die Peptide mit an der Entstehung des postischämischen Hirnödems und der Eröffnung der Blut-Hirnschranke (Maier-Hauff et al. 1984). Eine Aktivierung des Kallikrein/Kininsystems bei der zerebralen Ischämie konnte auch beim Menschen beobachtet werden (Makevnina et al. 1994). Hinweise, dass Bradykinin Leukozyten- Endothelinteraktionen aktiviert, gehen aus Untersuchungen der Haut von Mäusen und des Pankreas von Ratten hervor (Ahluwalia et al. 1996 und Hoffmann et al. 1996). Durch Applikation eines Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten kann die Infarktbildung bei der fokalen zerebralen Ischämie bei Ratten abgeschwächt werden (Relton et al. 1997). Die Autoren dieser Untersuchungen haben Bradykinin als

Entzündungsmediator für die Mitwirkung an der ischämischen Nekrosebildung verantwortlich gemacht, ohne weitere Detailmechanismen nennen zu können.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, Störungen der zerebralen Mikrozirkulation insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen zerebralen Ischämie von mongolischen Wüstenrennmäusen zu untersuchen, unter Berücksichtigung von neurologischen Defiziten und des ischämischen Hirnschadens. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen im Gehirn, insbesondere die Rolle der beiden Mediatoren PAF und Bradykinin aufgeklärt werden. In diese Fragestellung war deshalb auch die Prüfung des therapeutischen Potenzials von PAF- und Bradykinin-Rezeptorantagonisten im Hinblick auf die zerebrale Ischämie einbezogen.

2 Methodik

Die Untersuchungen wurden von 1995 bis 1999 im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Drs h.c. mult K. Meßmer) mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben AZ 211-2531-7/92 und AZ 211-2531-8/98) durchgeführt.

2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an 153 Gerbils - mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) - durchgeführt. Es wurden Tiere von zwei unterschiedlichen Stämmen verwendet. Für die Versuche zur Prüfung des PAF-Antagonisten WEB 2170 in niedriger Dosierung (2 mg/kg Körpergewicht) wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gezüchtete Tiere (Stammzucht der Firma Hoechst, Frankfurt am Main) eingesetzt. 31% der Tiere sind in der Ischämiephase verstorben. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Aus diesem Grund sind für die weiteren Versuche Tiere der Firma Centre d'élevage Janvier (Le Genest -St-Isle, Frankreich) verwendet worden. Diese Tieren hatten eine deutlich geringere Mortalität während der Ischämie. Die Wüstenrennmäuse wurden in Macrolonkäfigen Typ 3 bei 22°C Raumtemperatur, 60 % Luftfeuchtigkeit und einem künstlichgesteuerten zwölf Stunden Tag/Nachtzyklus gehalten. Futter (Trockenfutter, Ssniff Spezialdiäten, Soest, mit 18.000 I.E./kg Vit. A, 1280 I.E./kg Vit. D3 und 120 mg/kg Vit. E) und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Die männlichen Tiere hatten ein Mindestalter von zwölf Wochen und ein Körpergewicht von 60-80g.

2.2 Experimentelles Modell

2.2.1 Anästhesie

Die Narkose wurde mit Halothan (Halothan Hoechst®, Hoechst AG, Frankfurt am Main) durchgeführt. Das Gasgemisch bestand aus Luft mit Anreicherung von 30% Volumenanteil Sauerstoff und Halothan. Der inspiratorische Sauerstoffgehalt wurde oximetrisch (Oxidig, Drägerwerke AG, Lübeck) kontrolliert. Für die Narkose der spontan atmenden Tiere wurde ein abgeschnittener und abgepolsterter Spritzenkopf (20ml Spritze, Braun Melsungen AG, Melsungen) über die Schnauze gestülpt. Durch einen in diesen Spritzenkopf eingelassenen Gummischlauch wurde das Narkosegas (0,5 l/min) eingeleitet und durch einen zweiten Gummischlauch abgesaugt. Der Volumenanteil von Halothan im Gasgemisch wurde zur Einleitung auf 4%, während der chirurgischen Präparation auf 1,5%, während der Intravitalmikroskopie auf 0,6-0,8% und während der Ischämie auf 0,4% eingestellt, damit jederzeit eine ausreichend tiefe Narkose und ein konstant stabiler arterieller Blutdruck (MAP) gewährleistet waren.

2.2.2 Arterieller und venöser Zugang

Zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks wurde den Tieren ein Kunststoffkatheter mit einem Außendurchmesser von 0,61 mm sowie einem Innendurchmesser von 0,28 mm (Fa. Portex, Hythe, England) in die A. caudalis eingeführt. Der Katheter wurde kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung (0,2 ml/h, Fresenius, Bad Homburg) mit einer Perfusorpumpe (Perfusor segura, B.Braun, Melsungen) gespült. Der Katheter war an einen Druck-Transducer (DTX Plus, Fa. Spectramed, Düsseldorf) angeschlossen, dieser mit einem Messaufnahmesystem (Servomed SMS 308, Fa. Hellige GmbH, Freiburg im Breisgau) für den mittleren arteriellen Blutdruck verbunden.

Für die Infusion von Fluoreszenzfarbstoffen und von Inhibitoren wurde ein venöser Zugang geschaffen. Hierzu wurde ein weiterer Kunststoffkatheter (Dimensionen s.o., Fa. Portex, Hythe, England) in die linke V. femoralis implantiert.

2.2.3 Temperatur

Auskühlung wurde durch eine dem Tier untergelegte Heizplatte (Effenberger, Pfaffing) verhindert, deren Temperatur automatisch über eine rektale Temperatursonde geregelt wurde. Die Körpertemperatur wurde bei 37°C aufrecht erhalten. Auch die Kalotte und das kraniale Fenster wurden mit auf 37°C gewärmter Kochsalzlösung superfundiert, um eine lokale Hypothermie zu vermeiden.

2.2.4 Umschlingung der Halsschlagadern

Die Haut zwischen Unterkiefer und Manubrium sterni wurde mit einem medianen Schnitt eröffnet. Die Glandulae mandibulares und das Unterhautfettgewebe wurden mobilisiert. Die beiden Aa. carotides communes wurden in dem Winkel, den die Mm. sternohyoidei und cleidomastoidei bilden, ihrem Verlauf entlang der Trachea dargestellt. Dabei wurde besonderer Wert darauf gelegt, dass umliegende Strukturen, z.B. der Truncus vagosympathicus und der N. phrenicus, geschont blieben. Erst dann wurden die Schlagadern mit einem monofilen Prolenefaden (Stärke 5-0, Fa. Ethicon, Nordersted) angeschlungen. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Präparation keine Reduktion oder Unterbrechung der Durchblutung der Arterien hervorrief.

2.2.5 Transdurales Schädelfenster

Die bisher beschriebene Präparation wurde in Rückenlage durchgeführt. Danach wurde das Tier in Bauchlage in die stereotaktische Halterung (Mod. 51600, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) eingespannt. Die Gehörgänge wurden zuvor mit 1%iger Gingicainlösung (Hoechst, Frankfurt) anästhesiert. Nach medianem Hautschnitt von 2,5 cm Länge über der parietalen Kalotte wurden die Hautränder mit Seidenfäden (Stärke 3-0, Fa. Ethicon, Nordersted) aufgespannt. Das Periost über der linken parietalen Kalotte wurde sorgfältig entfernt. Mit einem elektrischen Bohrer (Rewatronik, München), in dessen Bohrfutter ein Rosenbohrer (Durchmesser der Spitze 0,6 mm, Fa. Aesculap, Tuttlingen) eingespannt war, wurde die Kalotte unter kontinuierlicher Kühlung rechteckig bis auf die Lamina interna abgefräst. Der dadurch entstandene 5 x 5 mm große Knochendeckel wurde vorsichtig mit

einer Pinzette von der Dura mater abgehoben. Kleine Blutungen aus Duragefäßen wurden mit Saugtupfern (Sugi, Fa. Kettenbach, Eschenburg) gestillt. Bei Verletzungen der Dura mater wurde das Tier vom Versuch ausgeschlossen. Durch Spannen der Hautfäden über ein Widerlager wurde ein mit Kochsalzlösung gefüllter Trichter von 1 cm Höhe gebildet.

2.2.6 Kontrastverstärkung des Plasmas

Um die pialen Gefäße unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurden dem Versuchstier 0,3 ml einer 0,5 % Lösung Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) mit einem Molekulargewicht von 150 000 Dalton intravenös injiziert (Sigma, Deisenhofen).

2.2.7 In vivo Markierung der Leukozyten mit Rhodamin 6G

Zur Darstellung von Leukozyten in der pialen Mikrozirkulation wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, Molekulargewicht: 479.02, Merck, Darmstadt) intravenös injiziert. Dieser Farbstoff akkumuliert in Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotenzial (Horobin et al. 1990 und Rashid et al. 1990). Erythrozyten werden nicht angefärbt, sie haben keine Mitochondrien. Die Gesamtmenge des Farbstoffs, die während der Intravitalmikroskopie gegeben wurde, betrug 1 ml einer 0,02% Lösung.

2.2.8 Prüfung der Blut-Hirnschranken-Integrität

Am Ende der akuten Versuchsphase drei Stunden nach der Ischämie wurde die Integrität der Blut-Hirnschranke überprüft. Für diesen Zweck wurden 0,3 ml einer 0,2% Na^+ -Fluoreszeinlösung ($C_{20}H_{12}O_5$, Molekulargewicht: 332.31) intravenös injiziert. Eine Übersichtsaufnahme der Präparation wurde sofort nach der Injektion und eine weitere Aufnahme 20 Minuten nach der Injektion mit einem 10 x Objektiv angefertigt. Bei Schädigung der Blut-Hirnschrankenintegrität kann der Indikator aus den Blutgefäßen

austreten und das Hirnparenchym anfärben.

Farbstoff	Markierung	Exzitations- maximum	Emissions- maximum
FITC-Dextran	Plasma	473 nm	514 nm
Rhodamin 6G	Leukozyten	528 nm	551 nm
Na⁺-Fluoreszein	Blut-Hirnschranken- Integrität	494 nm	520 nm

Tabelle 1: *In der Intravitalmikroskopie eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe, deren Exzitations- und Emissionsmaxima sowie Angaben über die Struktur, die mit dem jeweiligen Farbstoff markiert wurde.*

2.2.9 Intravitalmikroskopie

Die Mikroskopeinheit (Orthoplan, Leitz GmbH, Wetzlar) ist schwingungsarm auf einer 300 kg schweren Granitplatte montiert, die ihrerseits auf einem massiven Metallunterbau mit pneumatischen Füßen steht. Das Versuchstier wurde in der stereotaktischen Halterung unter das Mikroskop auf einem Tisch gelagert, der über ein Kugelgelenk in alle Richtungen gekippt werden konnte. Dies ermöglichte die Ausrichtung des Schädel Fensters in horizontaler Ebene. Der Kipptisch war auf einem Schrittmotor-getriebenen (IXE.C, Phytron, Gröbenzell) Kreuztisch (Fa. Leitz, München) montiert. Die Schrittmotoren waren elektronisch steuerbar und ließen Bewegungen auf horizontaler Ebene in 1 µm Intervallen zu. Durch die Aufzeichnung der jeweiligen Koordinaten konnten identische Gefäßsegmente über den gesamten Versuchszeitraum von 4½ Stunden exakt wiedergefunden und analysiert werden. Für die Fluoreszenz- Epiilluminatoren (Ploemopak, Leica, München) wurde eine 75 W Xenon-Lampe (XBO 75 W/2, Fa. Leitz, München) als Lichtquelle eingesetzt. Das Licht passierte zunächst einen 7mm Hitzefilter (Fa. Leitz, München) und eine variable Irisblende, daraufhin einen Anregungsfilter. Über einen Teilerspiegel mit Reflexionskurzpassfilter fällt das Licht durch Objektive (Salzwasser- Immersionsobjektiv 25 x, 0,6 numerische Apertur oder Objektiv 10 x, 0,22

numerische Apertur, Leitz GmbH, Wetzlar) auf die Präparation. Das Objektiv wirkt dabei gleichzeitig als Kondensor. Das aufgrund dieser Anregung emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über das Objektiv zum Reflexionskurzpassfilter, an dem es aufgrund seiner größeren Wellenlänge abgelenkt wird und über Sperrfilter und einen weiteren Spiegel zum Okular (Periplan 10 x, Leitz GmbH, Wetzlar) bzw. direkt über einen C-Mount-Adapter zur Videokamera gelangt.

Filterblock	Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
L3	FITC-Dextran/ Na ⁺ -Fluoreszein	BP 450-490 nm	RKP 510 nm	BP 525/20 nm
N2	Rhodamine 6G	BP 530-560 nm	RKP 580 nm	LP 580 nm

Tabelle 2: *Spektren der Ploemopak-Auflichtilluminatoren (Becker 1990) BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter, RKP: Reflexions-Kurzpassfilter.*

Die Beobachtung der Mikrozirkulation erfolgte mit dem 25 x Objektiv, die der Blut-Hirnschrankenintegrität mit dem 10 x Objektiv. Die Bildsequenzen wurden mit einer hochauflösenden (Auflösung: 500 TV-Linien bei einer geometrischen Verzerrung von maximal $\pm 3\%$) Silizium Intensified Target (SIT) Restlichtkamera (C2400-08, Fa. Hamamatsu Photonics, Herrsching) aufgenommen, die durch eine hohe Sensitivität im Wellenlängenbereich von 400-650 nm charakterisiert ist. Die Bilder wurden mit einem Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München) mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde auf S-VHS Videobändern (MQSE-120, Sony, Köln) aufgezeichnet. Über einen Videozeitgenerator wurden simultan das Datum und die Uhrzeit in das Videobild eingespielt. Die Aufnahmen konnten simultan mit einem Trinitron Farbvideomonitor (PVM-2730 QM, Sony, Köln) in 930-facher Vergrößerung betrachtet werden.

2.2.10 Mikroskopierareal

Nach Positionierung des Versuchstiers unter dem Intravitalmikroskop wurde das kraniale Fenster in der Horizontalen ausgerichtet. Geeignete Areale der pialen Mikrozirkulation auf der parietalen Hirnrinde wurden zunächst mit der Übersichtsvergrößerung (Objektiv: 10 x) aufgesucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Blutgefäße der Kortexoberfläche nicht von größeren Blutgefäßen der Dura mater verdeckt wurden und die im Bildausschnitt beobachteten Gefäße möglichst in einer Fokusebene lagen. Danach wurden mit der höheren Vergrößerung (Objektiv: 25 x) Areale und deren Koordinaten zum Beginn der Aufzeichnungsphase festgelegt. Dadurch konnten die identischen Gefäßareale zu der im Protokoll festgelegten Zeit quantitativ analysiert werden. Bei jedem Versuchstier wurde ein Gebiet mit einer Arteriole und einer Venole in Nachbarschaft zueinander, je ein Gebiet mit einer größeren und einer kleineren Venole, sowie ein Gebiet mit überwiegend kapillären Gefäßen untersucht. Jedes Areal wurde 30 Sekunden lang mit dem N2- und zehn Sekunden mit dem L3-Filterblock aufgezeichnet.

2.2.11 Quantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Sequenzen wurden auf Videoband aufgenommen. Die quantitative Auswertung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt. Die Videoszenen wurden mit Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München) und Videomonitor (PVM-2730 QM, Sony, Köln) wiedergegeben. Einzelne Bilder konnten mit Hilfe einer Videokarte (Matrox, Dorval, Kanada) digitalisiert werden. Mit einem IBM-AT-kompatiblen Bildverarbeitungsprogramm (CapImage, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) wurden Gefäßdurchmesser und Kapillardichte bestimmt. Auf dem Computersystem mit einem 15" Bildschirm wurde eine 790-fache Vergrößerung erreicht. Die Auflösung des PAL Videosystems ist festgelegt bei 768 x 576 (Breite x Höhe) Pixeln, damit lag die Pixelgröße bei 0,7067 μm horizontal und 0,5155 μm vertikal. Hieraus ergibt sich eine Genauigkeit bei der Bestimmung von Durchmessern von $\pm 1,4 \mu\text{m}$. Weil an beiden Rändern des Gefäßes maximal ein Pixel falsch ausgewählt werden kann, ergibt sich ein Messfehler bei einem Gefäßdurchmesser von angenommen 40 μm von $\pm 3,5 \%$. Der Durchmesser von Kapillaren wird in der

Literatur mit 4-8 μm angegeben. Bei einem mittleren Kapillardurchmesser von 6 μm liegt der Messfehler bei 23 %. Deshalb wurde die Messung der Durchmesser dieser Blutgefäße nicht durchgeführt.

Die folgenden Parameter wurden quantifiziert:

- Gefäßdurchmesser von Arteriolen und Venolen [μm]
- Leukozyten-Endothelinteraktionen [$n \times 100\mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$]
- funktionelle Kapillardichte [cm^{-1}]
- arterio-venöse Transitzeit [sec]

2.2.11.1 Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser von Arteriolen und Venolen wurden off-line in den Videoaufnahmen bestimmt. Als Gefäßgrenze galt der Übergang vom hellen, durch FITC-Dextran gefärbten Plasma, zum nicht angefärbten Endothel. Zu den verschiedenen Untersuchungszeiten wurden stets die selben Gefäßsegmente vermessen. Die auf dem Bildschirm dargestellten Gefäßränder wurden möglichst senkrecht zum Gefäßverlauf mit der Maus angeklickt. Das Bildverarbeitungsprogramm summiert die Anzahl der Pixel zwischen beiden dadurch festgelegten Punkten der gegenüber liegenden Gefäßränder und errechnet damit die dazwischen liegende Strecke. Jede Messung wurde doppelt durchgeführt und der Mittelwert beider Messungen als Durchmesser [μm] protokolliert.

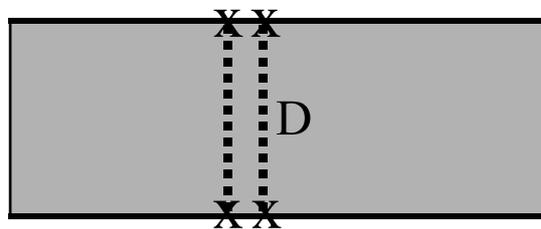


Abbildung 1: Bestimmung des Gefäßdurchmessers (D) nach Festlegung der Gefäßgrenzen mit dem Computer gestützten Auswertesystem (s. Text)

2.2.11.2 Kapillardichte

Zur Bestimmung der Kapillardichte der exponierten Hirnoberfläche wurden die Videoszenen nach Kontrastierung der Gefäße mit Rhodamin 6G aufgenommen. Es wurde postuliert, dass nach Bolusinjektion von Rhodamin 6G kontrastierte Kapillaren mit Plasma und Blutzellen perfundiert waren. War eine Kapillare durch einen Leukozyten verlegt, dann leuchtete dieses Gefäßsegment nicht auf. Im Auswerteprogramm wurden die Kapillaren von Hand in einem Areal von $0,083236 \text{ mm}^2$ nachgezeichnet, das Programm errechnete damit die Kapillardichte als Länge pro Fläche [cm^{-1}].

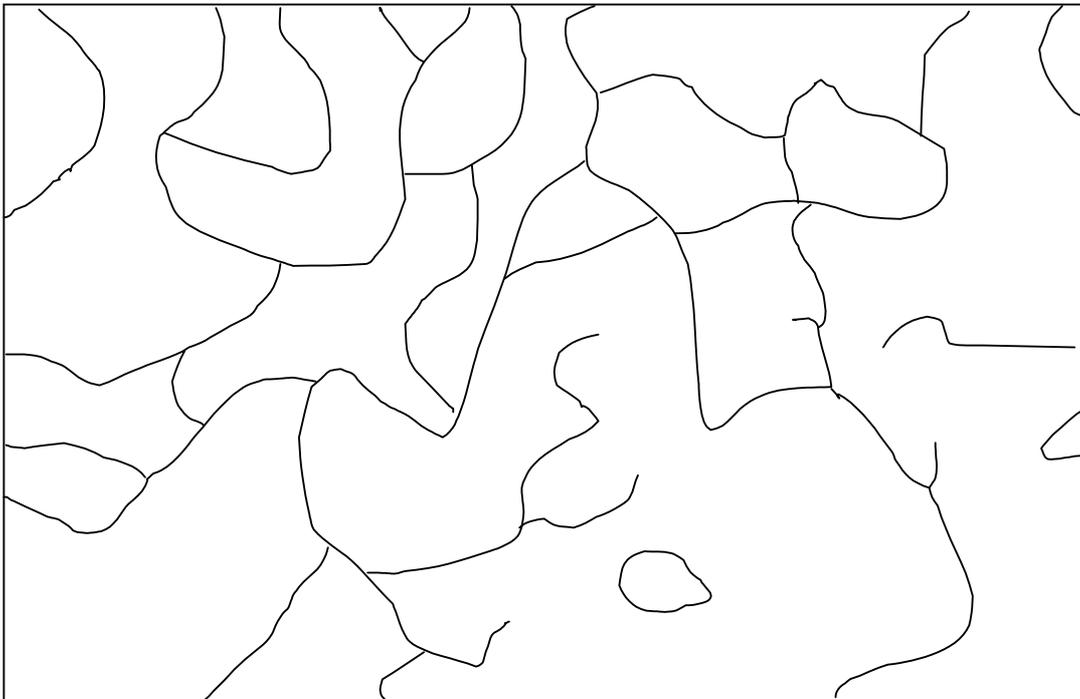


Abbildung 2: *Darstellung der von Hand nachgezogenen Kapillaren eines Originalvideobildes; das Auswertesystem errechnete die Länge der Linien pro Fläche.*

2.2.11.3 Rollen von Leukozyten

Die Anzahl rollender Leukozyten in postkapillären Venolen wurde quantitativ bestimmt. Drei verschiedene Kriterien lassen die Definition Leukozytenrollen zu: Erstens, die

Geschwindigkeit von rollenden Leukozyten muss deutlich langsamer als die Geschwindigkeit von Blutzellen im Zentralstrom sein. Zweitens, ein rollender Leukozyt hat Kontakt mit der Gefäßinnenwand. Drittens, eine rollender Leukozyt dreht sich um die eigene Achse. Rollende Leukozyten wurden in einem Gefäßabschnitt von 100 μm Länge durch Auflegen einer Maske auf dem Videomonitor über einen Zeitraum von 30 Sekunden gezählt. Das Ergebnis ist als $n \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wiedergegeben.

2.2.11.4 Adhärenz von Leukozyten

In postkapillären Venolen wurden fest adhärenente Leukozyten (“Sticker”) ebenfalls quantitativ bestimmt. Definitionsgemäß haften diese Zellen mindestens 20 Sekunden fest an der Gefäßinnenwand, ohne sich zu bewegen. “Sticker” [$n \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$] wurden im selben Gefäßabschnitt wie auch die rollenden Leukozyten über einen Zeitraum von 30 Sekunden gezählt.

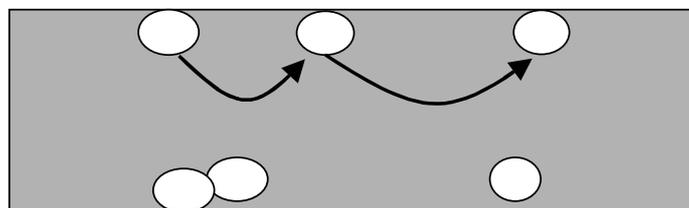


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Leukozytenrollen (oben) und -adhärenz (unten). Nur im Videofilm ist eine Unterscheidung von rollenden und fest adhärenenten Leukozyten möglich.

2.2.11.5 Arterio-venöse Transitzeit

Zur quantitativen Bestimmung der lokalen mikrovaskulären Durchblutung wurde die arterio-venöse Transitzeit (AVTT) gemessen. Die auf der Indikator-Verdünnung beruhende Methode wurde experimentell von Wolff und Blumgart eingeführt, später von Kety und Schmidt auch klinisch eingesetzt (Wolff et al. 1929, Kety 1951). Da im Gehirn keine “thoroughfare channels” (Shunts) vorliegen (Kety 1960), auch ein “capillary

recruitment“ nicht vorhanden ist und die zerebrale Durchblutung nur durch die Geschwindigkeit der Kapillarperfusion bestimmt wird (s.a. Kapitel 4.2.2) spiegelt die arterio-venöse Transitzeit die Durchblutung des Gehirnparenchyms dar, das durch die beobachtete Arteriole versorgt und die beobachtete Venole drainiert wird.

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

$$Q = \frac{1}{AVTT}$$

Gleichung 1: *Bestimmung der regionalen Durchblutung als Funktion der arterio-venösen Transitzeit (AVTT) - je kürzer die Transitzeit, desto höher die Durchblutung.*

Bei den Experimenten wurde ein Bolus Rhodamin 6G nach der im Protokoll festgelegten Zeit in die V. femoralis injiziert. Gleichzeitig wurden Aufnahmen des Areals, in dem eine Arteriole und Venole in direkter Nachbarschaft zueinander lagen, mit der Epifluoreszenz-Videomikroskopie angefertigt. Dies ermöglichte die Aufzeichnung von Anflutung und Auswaschung des Indikators in der Arteriole und Venole.

Nach dem Versuch wurden die Videosequenzen des S-VHS Videorekorders (AG-7350, Panasonic, München) mit einem Computer digitalisiert. Mit Hilfe eines Bildanalyseprogrammes (IBAS 2.0, Kontron, Eching) war es möglich, Veränderungen der Grauwerte durch den Bolus im gewünschten Areal zu messen. Über einen Zeitraum von sechs Sekunden wurden pro 273 Millisekunden ein Bild, also insgesamt 22 Bilder, digitalisiert. Messfenster mit einer Größe von 40 x 40 Pixel und in Ausnahmefällen, bei geringerem Gefäßdurchmesser mit einer Größe von 20 x 20 Pixel wurden über eine Arteriole und eine Venole gelegt. Von jedem der 22 Bilder wurde die Indikatorintensität als Mittelwert der Grauwerte der Pixel bestimmt und in Tabellenform formatiert. Das Einlesen der Daten in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft, Seattle, USA)

machte das mathematische Bearbeiten der Messwerte möglich. Um den Arbeitsaufwand für die Berechnung der arterio-venösen Transitzeit möglichst gering zu halten, wurde eine spezielle Rechenmatrize geschrieben. Mit der Matrize wurden pro Aufnahmesequenz etwa 800 Rechenschritte, damit 7200 Rechenschritte pro Versuch automatisiert durchgeführt. Die einzelnen Rechenschritte sind in der Abbildung 5 erklärt. Die Berechnung der arterio-venösen Transitzeit beruht auf einer Differenz-Integral-Methode. Deren Prinzip ist der Vergleich der zusätzliche Verzögerung der Anflutung und der Auswaschung eines Farbstoffbolus einer Vene zu einer gepaarten Arterie. Die Kenntnis eines Partitionskoeffizienten zwischen Blutgefäß und Gewebe, die Zeit zwischen Bolusinjektion und Anflutung in der Arterie ist nicht erforderlich (Rovainen et al. 1993).

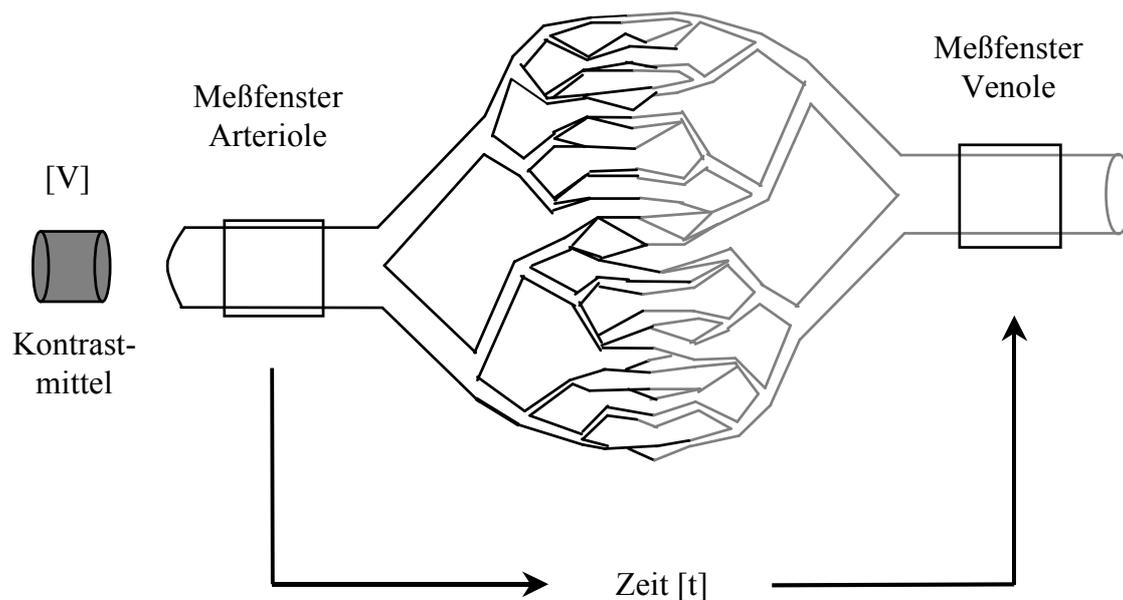


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Messung der arterio-venösen Transitzeit (AVTT). Ein Kontrastmittelbolus $[V]$ tritt in das Messfenster über einer Arteriole ein, verteilt sich im Kapillarnetz, wird in der Venole wieder gesammelt und passiert das Messfenster über einer Venole. Die Dauer $[t]$ zwischen Anflutung und Auswaschung des Kontrastmediums in Arteriole und Venole ist ein Maß für die Durchblutung (s.a. Gleichung 1).

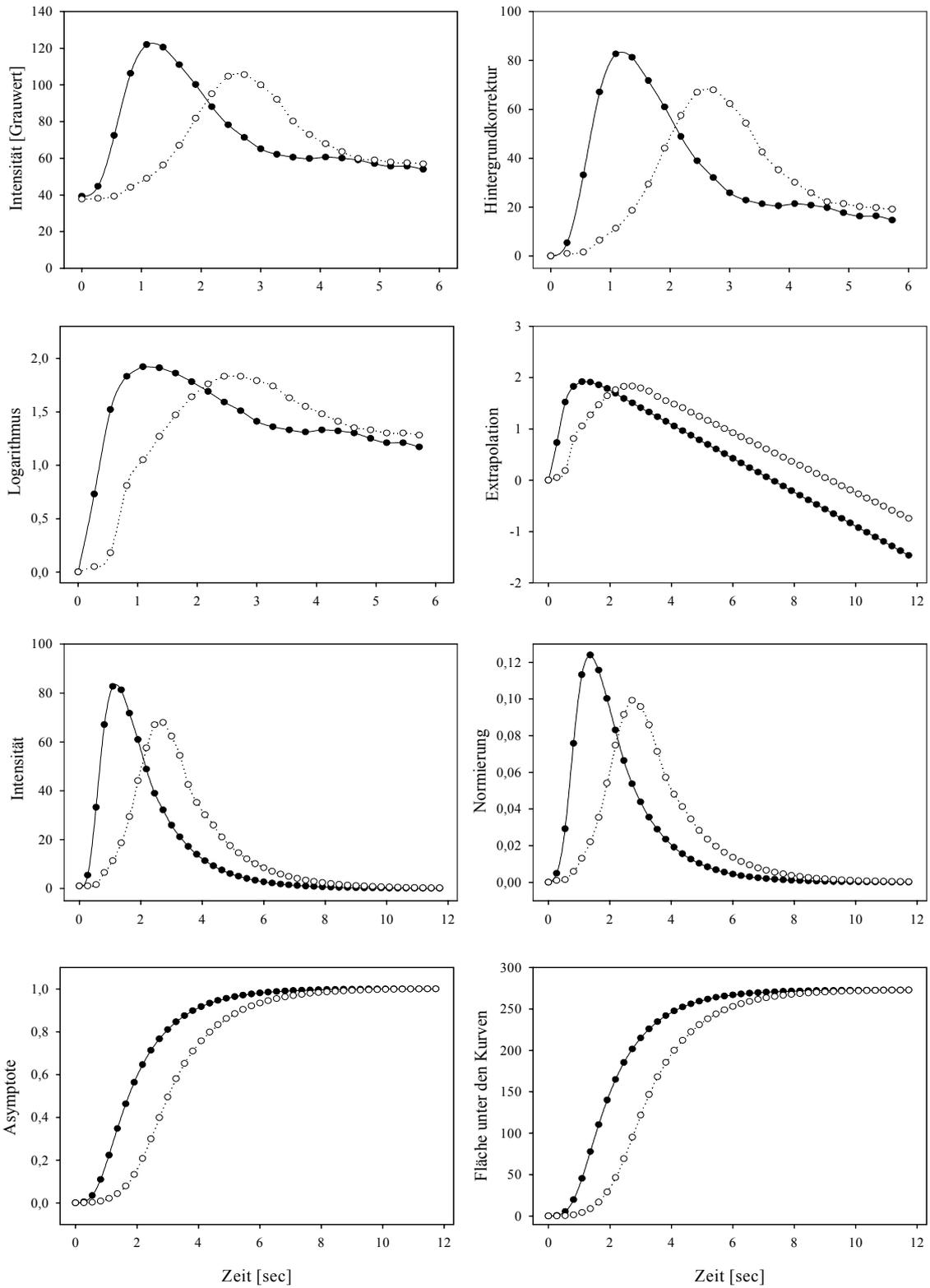


Abbildung 5:

Graphische Darstellung der einzelnen Schritte zur Berechnung der arterio-venösen Transitzeit (AVTT). Kurve 1 zeigt Rohwerte; jeder Punkt der Kurve gibt die Farbstoffintensität als mittlere Grauwerte aller Pixel zu einer bestimmten Zeit wieder. Die Subtraktion der vor Bolusgabe bestimmten Fluoreszenzintensität ergibt eine Kurve, die nur das Anfluten und Auswaschen des Farbstoffbolus zeigt. Nach raschem Anstieg fällt die Intensität wieder ab. Die Rezirkulation des Kontrastmediums verhindert, dass die Intensität in den Bereich der Ausgangswerte abfällt. Durch Logarithmieren entsteht eine Kurve, bei der ohne Rezirkulation die Auswaschkinetik linear verlief. Aus dem Anfangsteil der abfallenden Kurve – vor Einsetzen der Rezirkulation – kann jedoch ein Verlauf mit linearer Kinetik errechnet werden. Die einer Rezirkulation entsprechenden Intensitäten werden sodann durch Werte der linearen Kinetik ersetzt. Das nachfolgende Delogarithmieren ergibt nun eine Kinetik für Anfluten und asymptotischer, gegen Null strebender Auswaschung ohne Störung durch Rezirkulation. Durch Integration ergibt sich die Fläche unter der Kurve, gefolgt von einer rechnerischen Normierung, wobei die Fläche für Arteriole und Venole gleich 1 gesetzt wurde. Die Summierung der Teilflächen unter der Kurve ergibt den asymptotischen Verlauf der Flächenzunahme. Durch erneute Integration dieser Kurve kann nun die Fläche unter der Kurve mit der Dimension fraktionelle Änderung \times Sekunde berechnet werden. Als letzter Schritt werden beide Flächen (Arteriole-Venole) voneinander subtrahiert, man erhält die arterio-venöse Transitzeit. In vorliegendem Fall der Abbildung 5 liegt sie bei 1,27 Sekunden.

2.2.12 Globale zerebrale Ischämie

Die globale zerebrale Ischämie von 15 Minuten Dauer wurde durch Okklusion beider Aa. carotides communes induziert. Durch Beschweren des zuvor um die Arterien geschlungenen Prolenefadens mit 15 Gramm wurde die Hirndurchblutung vollständig unterbrochen. 15 Minuten später wurde für die Wiederherstellung der Durchblutung in beiden Arterien die Okklusion durch Scherenschlag des Fadens beendet. Die anatomische Besonderheit des inkompletten Circulus Willisi von Gerbils (Levy et al. 1974) schließt eine arterielle Kollateralversorgung des Großhirns über die Aa. vertebrales weitgehend aus. Die A. carotis communis versorgt die Aa. cerebri anterior, media und posterior. Die A. basilaris endet in den beiden Aa. cerebelli superiores sowie in zwei den Hypothalamus versorgenden Arterien (Kahn 1972).

2.2.13 Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht

Der akuten Versuchsphase zur Untersuchung der Mikrozirkulation folgte eine chronische

Phase. Nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden die Katheter entfernt und die Haut vernäht. Die Versuchstiere erwachten unter Beobachtung und wurden danach wieder in den Tierstall verbracht. Der neurologische Status, das Verhalten der Tiere und das Körpergewicht wurden an jedem Abend protokolliert. Am Abend des vierten Tags nach der Ischämie wurden die Versuchstiere für die histologische Beurteilung des Gehirns perfusionsfixiert.

Neurologische Untersuchung	Punkte vorhanden/fehlt
Kornealreflex	2
Pinnareflex	2
Greifreflex	2
Fallreflex	1
Fluchtreflex	2
Kopf drehen	2
Drehen	1
Schiefe Ebene	2
Spontane Motilität	2
Knabbern	2
Circling	0 / 2
Flexion der Vorderpfote	0 / 1
Drehung des Thoraxes	0 / 1

Tabelle 3: Funktions-Punkteskala zur Beurteilung der Neurologie und des Verhaltens von Gerbils nach der zerebralen Ischämie (modifiziert nach McGraw 1977).

Beschreibung der Tests im Einzelnen:

Der Kornealreflex wurde durch Bestreichen der Kornea mit Fasern eines Wattebausches, der Pinnareflex durch Bestreichen der Haare der Ohrmuschel ausgelöst. Beim gesunden Tier führte dies zum Anlegen der Ohren an den Kopf. Der Greifreflex wurde durch Anbieten eines Holzstäbchens getestet. Der freie Fall wurde durch Anheben des Tieres am Schwanz unter Annäherung an den Boden simuliert. Vom gesunden Tier wurden die

Vorderpfoten gestreckt; es begann mit Laufbewegungen (Fallreflex). Ein Umgreifen des Tieres an den Flanken löste einen sprunghaften Befreiungsversuch aus (Fluchtreflex). Leichtes Bestreichen des Fells an der Schulter resultierte in einer Drehbewegung des Kopfes in Richtung des Stimulus (Kopf drehen). Es war nahezu unmöglich, ein gesundes Tier auf den Rücken zu legen; es drehte sich bei jedem Versuch sofort wieder um (Drehen). Setzte man eine Wüstenrennmaus unten auf eine schiefe Ebene (50 % Steigung), krabbelte sie sofort nach oben. Bei Erreichen der Maximalhöhe innerhalb von 15 Sekunden wurden zwei Punkte vergeben, brauchte das Tier 15-30 Sekunden nur ein Punkt, benötigte es noch länger oder bewegte sich nach unten null Punkte (schiefe Ebene). Zur Beurteilung der spontanen Motilität wurde das Tier auf den Boden gesetzt und beobachtet. Normales Verhalten war dadurch erkennbar, dass das Tier sofort die Umgebung erkundet, nicht im Kreis lief, sondern sich eher sternförmig zu den Seitenwänden bewegte und an den Ausgangsort zurückkehrte. "Circling" lag vor, wenn das Tier im engen Radius um die eigene Achse lief. Zur Prüfung des artspezifischen Nagens wurde den Tieren ein Pappkarton (5 x 7cm) in den Käfig gelegt. Die Nageaktivität, d. h. das Zernagen von Pappe, Holz oder Papier, ist ein Hinweis auf Nestbau (Glickman et al. 1967). Bei Flexion einer Vorderpfote oder Verkrümmung der Wirbelsäule wurde ein fokaler Schaden des Gehirns vermutet.

2.2.14 Histologie

Der Schweregrad des ischämischen Hirnschadens wurde histomorphometrisch bestimmt. Die Versuchstiere wurden für diesen Zweck mit 2 % Phosphat-gepufferter (pH 7,4) Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert. In tiefer Halothannarkose wurde der Thorax eröffnet, mit einer stumpfen Kanüle (20 G) der linke Herzventrikel punktiert und das rechte Atrium mit einem Scherenschlag eröffnet. Das Gefäßsystem wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung unter dem Druck einer 100 cm hohen Wassersäule gespült, bis das Effluat aus dem Atrium klar war. Das fixierte Gehirn wurde sorgfältig aus dem Kраниum freipräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in 2 %

Paraformaldehydlösung aufbewahrt. Das Organ wurde in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden koronare 5 μm dicke Serienschnitte angefertigt und mit Kresylviolet (Nissl-Färbung) gefärbt.

2.2.15 Versuchsprotokoll

Das Versuchsprotokoll kann in eine akute und eine chronische Phase unterteilt werden. In der akuten Phase wurde die Mikrozirkulation des Gehirns durch Intravitalmikroskopie vor und nach der Ischämie untersucht. In der chronischen Phase nach der Ischämie wurden die Versuchstiere täglich neurologisch untersucht. Den Abschluss bildet die Histomorphometrie des Gehirns nach dessen Entnahme am vierten postischämischen Tag.

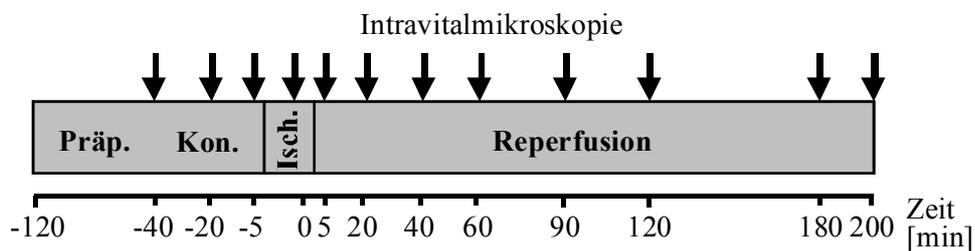


Abbildung 6: Versuchsprotokoll der Akutphase; Zeitpunkt 0 min ist der Anfang der Ischämie.

2.2.16 Histomorphometrie

Die histologische Auswertung der Serienschnitte erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) mit einem 10x Objektiv (n. A. 0,3). Mit einer Farb-CCD Kamera (XC 003P, Sony, Köln) und deren Anschluss an eine Bildwandlerkarte eines IBM-AT- kompatiblen Personal Computers wurden die histologischen Befunde unter

Zuhilfenahme eines Bildverarbeitungsprogramms (Optimas) ausgewertet. Die Gesamtvergrößerung war 600-fach.

In je einem Standardschnitt 1,7 mm kaudal des Bregmas wurden der parietale Neokortex und der Hippokampus sowie 0,5 mm rostral des Bregmas der frontoparietale Neokortex und das Striatum beurteilt. Beide Hemisphären wurden getrennt ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt. Die überlebenden Nervenzellen wurden in dem CA1-, CA2-, CA3- und CA3/4-Sektor des Hippokampus quantifiziert. Das Fenster für den CA1-Sektor (0,31 x 0,12 mm) orientierte sich am lateralen Ende des oberen Astes des Gyrus dentatus. Das Fenster für den CA2-Sektor (0,34 x 0,13 mm) wurde nahe der lateralen Konvexität des Nervenzellbandes platziert. Die Fensterposition für den CA3-Sektor (0,39 x 0,15 mm) war die Mitte zwischen der lateralen Konvexität und dem lateralen Ende des oberen Astes des Gyrus dentatus. Das Fenster für den CA3- und CA4-Sektor (0,3 x 0,12 mm) befand sich

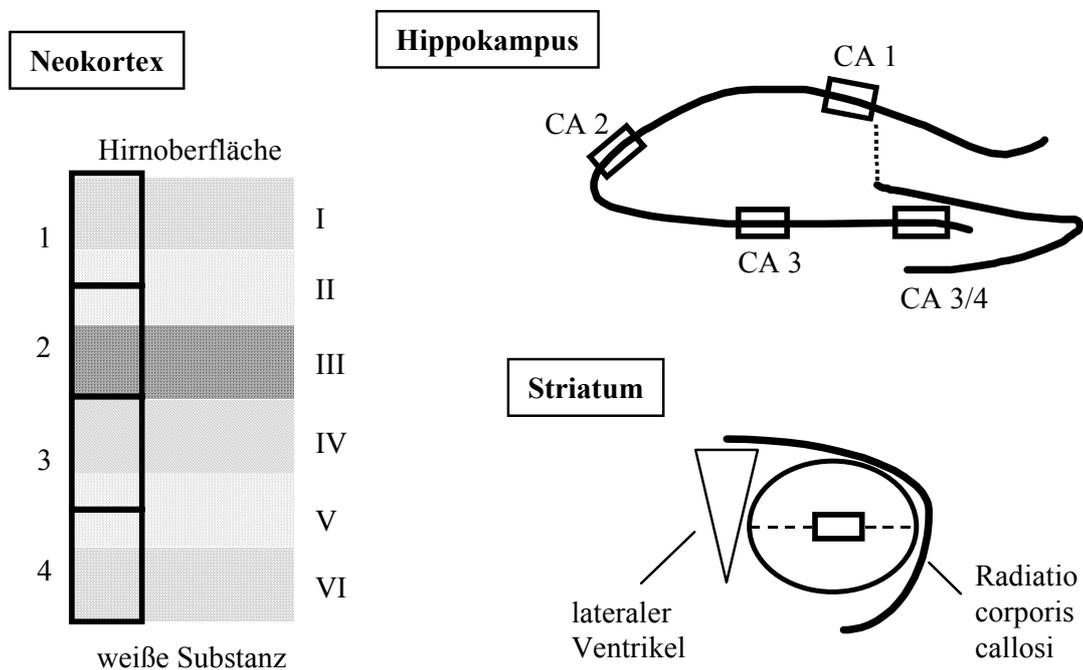


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Fenster im histologischen Schnitt für die Quantifizierung von überlebenden Nervenzellen nach der Ischämie.

zwischen den Ästen des Gyrus dentatus. Das Fenster für das Striatum (0,35 x 0,25 mm) wurde zentral zwischen dem Seitenventrikel und der Radiatio corporis callosi positioniert. Die Quantifizierung von vitalen Nervenzellen des Neokortex konnte sich allerdings nicht an den sechs anatomischen Laminae orientieren, weil deren Abgrenzung voneinander im ischämisch geschädigtem Gewebe nicht mehr zuverlässig möglich war. Statt dessen wurden vier Fenster (0,3 x 0,2 mm) in vertikaler Orientierung übereinander im Kortex drei mm lateral von der Mittellinie ausgewertet. Das Auszählen der Nervenzellen wurde ohne Kenntnis der jeweiligen Therapie (verblindet) durchgeführt.

Lebende Nervenzellen wurden nach folgenden Kriterien klassifiziert (Stummer et al. 1995):

- Scharf abgegrenzter Nukleus mit ellipsoider oder runder Form
- Deutlich erkennbarer Nukleolus zentral im Nukleus gelegen
- Nukleus nur wenig dunkler als umgebendes Neuropil
- Neuronales Zytoplasma klar vom umgebenden Neuropil demarkiert
- Weniger als ein Drittel des Neurons von konfluierenden Vakuolen umgeben (perizelluläres Halo)

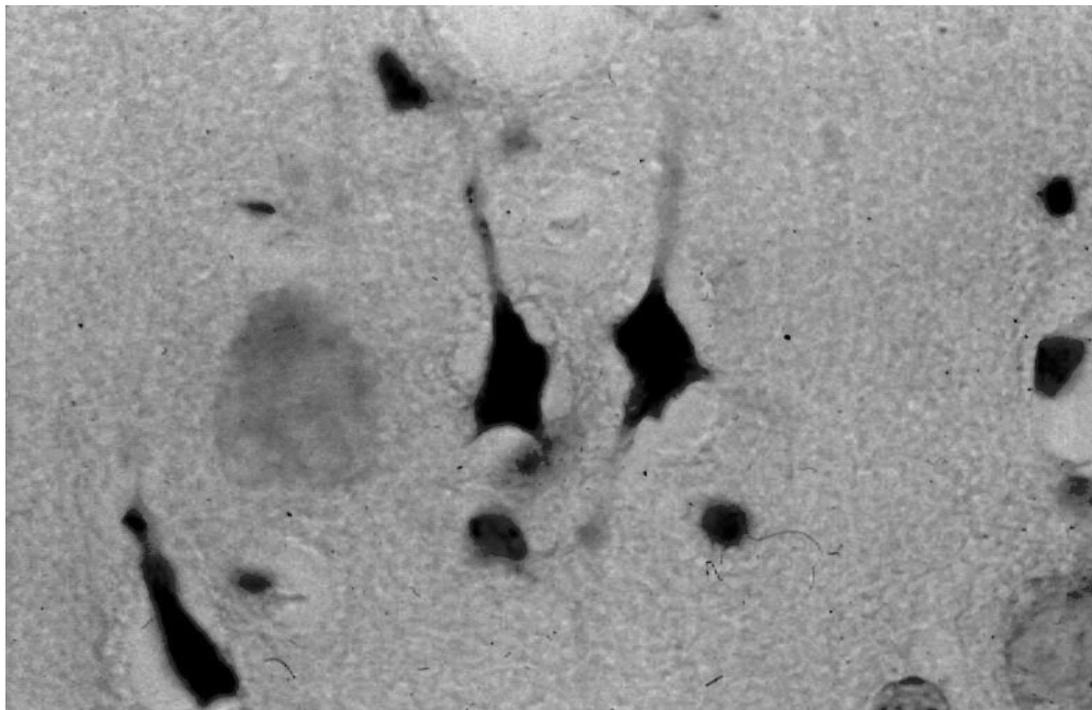
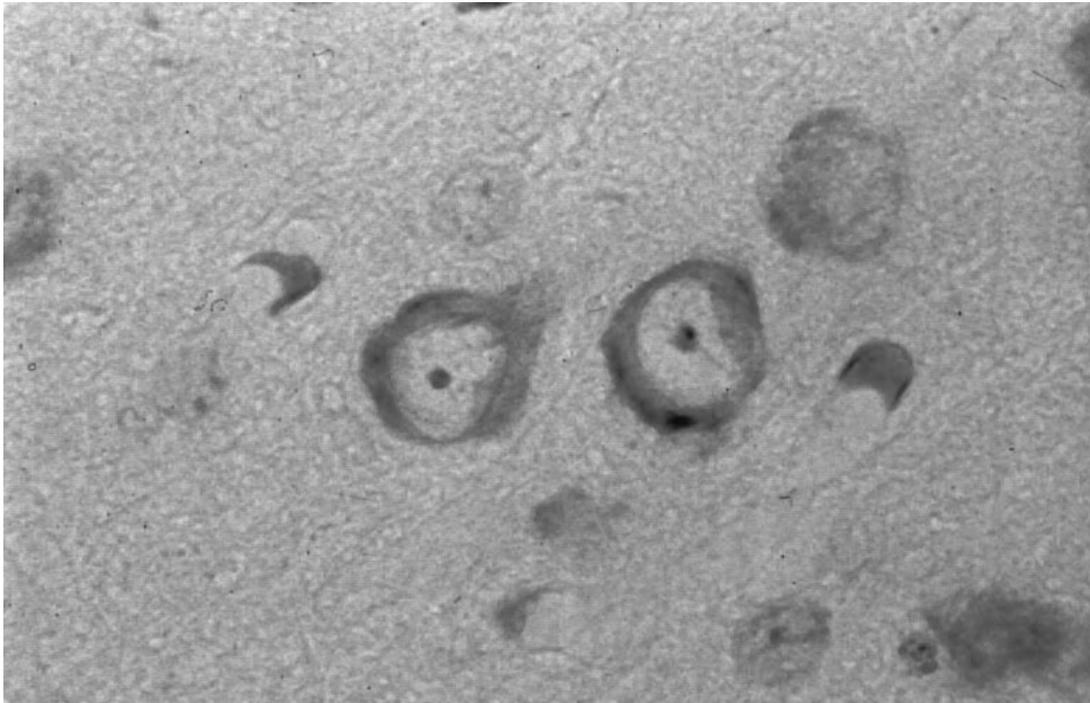


Abbildung 8: *Histologische Schnitte vom parietalen Kortex des Gehirns von Wüstenrennmäusen vier Tage nach globaler zerebraler Ischämie (Nissl-Färbung). Im oberen Bild sind zwei vitale Nervenzellen und im unteren Bild in der Mitte zwei avitale Nervenzellen zu erkennen. Die Beurteilung erfolgte nach den im Text angegebenen Kriterien.*

2.2.17 Osmotische Minipumpe

Zur kontinuierlichen subkutanen Infusion der Bradykinin-Rezeptorantagonisten wurde den Tieren eine osmotische Minipumpe mit einem Durchmesser von sechs mm und einer Länge von 15 mm (1007D, alzet, alza corporation, Palo Alto, CA, USA) unter die Rückenhaut implantiert. Dafür wurde ein zwei cm langer Hautschnitt entlang der Wirbelkörper gelegt, mit einer Pinzette eine subkutane Tasche geformt, die Pumpe in diese Tasche gelegt und danach die Haut mit einer Naht (Mersilene 5-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Diese Pumpe hat einen Fluss von 0,5 $\mu\text{l/h}$, eine Pumpdauer von sieben Tagen und ein Reservoirvolumen von 500 μl . Das Reservoir, von dem die Lösung mit Inhibitor abgegeben wird, ist von einem Behälter ummantelt, der eine hyperosmolare Lösung enthält. Dieser Behälter ist aus wasser-durchlässigem Zelluloseester angefertigt. Durch Implantation der Pumpe in das physiologisch-osmotische Milieu mit 300 mosmol kann Wasser entlang des osmotischen Gefälles in den Behälter einströmen. Diese Volumenzunahme verdrängt die im Reservoir befindliche Lösung. Der sehr konstante Fluss lag bei der verwendeten Charge von Pumpen bei $0,51 \pm 0,02 \mu\text{l/h}$ (MW \pm SEM).

2.3 PAF-Rezeptorantagonist WEB 2170

WEB 2170 (Bepafant) ist ein potenter PAF-Rezeptor-Antagonist und gehört in die Gruppe der Hetrazepine (von Boehringer Ingelheim zur Verfügung gestellt). Die Strukturformel von WEB 2170 lautet: 8(R,S)-6-(2-Chlorophenyl)8,9-dihydro-1-methyl-8-(4-morpholinylcarbonyl)-4 H,7 H-Cyclopenta(4,5)thieno(3,2-f)(1,2,4)triazolo (4,3-a)(1,4) Diazepine (Casals et al. 1990). Im Gegensatz zu Diazepam haben die Hetrazepine keinerlei sedative Eigenschaften. Die Wirksamkeit des Antagonisten wurde bereits bei verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen. PAF-antagonisierende Eigenschaften, wie z.B. die Verhinderung eines Blutdruckabfalls oder Lyse einer Bronchokonstriktion nach exogener Zufuhr von PAF sind bei Ratten bzw. bei Hamstern in einer Dosis von ED₅₀ = 0,006 bzw. 0,016 (mg/kg) gefunden worden (Casals et al. 1990). Untersuchungen des

Ischämie/Reperfusionsschadens der Leber und des Herzens haben gezeigt, dass dieser PAF-Antagonist in einer Dosis von 7 mg/kg alle sechs Stunden bzw. 1 mg/kg als Bolus gefolgt von 2 mg/kg als kontinuierliche Infusion protektiv ist. Die Halbwertszeit nach intravenöser Verabreichung beträgt bei der Ratte 2,3 Stunden und beim Kaninchen 2,7 Stunden (Casals et al. 1990, Montrucchio et al. 1993).

Mit diesem PAF-Rezeptorantagonisten wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Als Niedrigdosis wurden 2 mg/kg KG WEB 2170 verabreicht, als Hochdosis 20 mg/kg KG. Der Antagonist wurde täglich in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung frisch gelöst. Die Gabe erfolgte als einmaliger Bolus 15 Minuten vor der Ischämie.

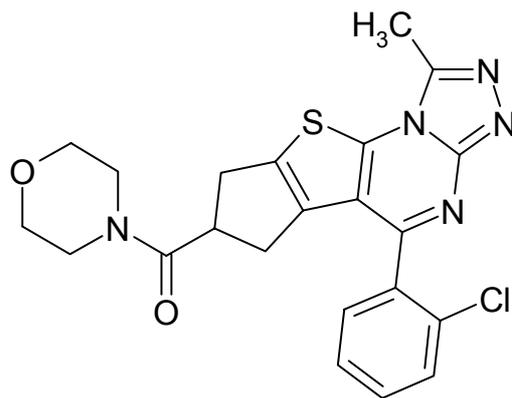


Abbildung 10: Strukturformel von WEB 2170 (Casals et al. 1990).

2.4 Bradykinin B1-Rezeptorantagonist B 9858

Für die Experimente wurde der selektive Bradykinin B1-Rezeptorantagonist B 9858 eingesetzt (Gera et al. 1996b). Die Struktur des natürlichen Agonisten des B1-Rezeptors, des-Arg-Bradykinin, wurde durch Ersatz bzw. Hinzufügen verschiedener Aminosäuren verändert. An Position 8 ist die nicht natürlich vorkommende Aminosäure Oic

(Octahydroindole-2-carboxylsäure) eingefügt, an Position 5 und 7 sind Phenylalanin bzw. Prolin durch die nicht natürliche Aminosäure Igl (a-(2-indanyl)glyzin) ersetzt. An das N-terminale Ende sind zwei Moleküle Lysin angehängt.

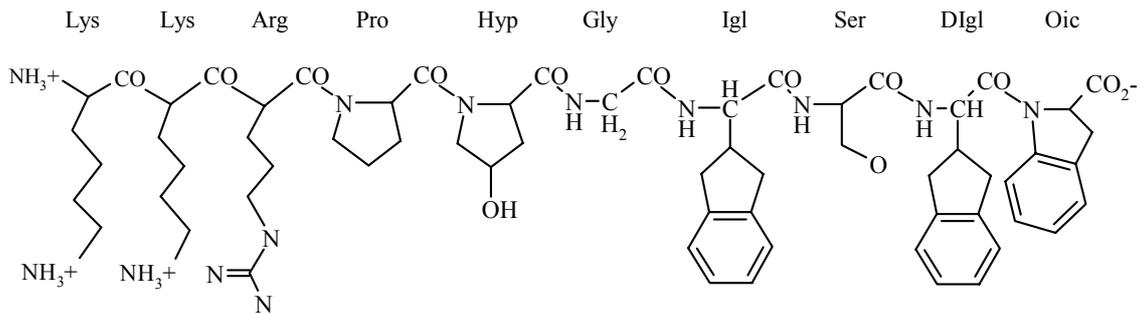


Abbildung 11: Strukturformel von B 9858 (Sejbal et al. 1997).

Der Antagonist hat eine starke Affinität zum B1-Rezeptor mit einer IC₅₀ (inactivation concentration 50%) von 10,1 bei humanen IMR-90 Fibroblasten der Lunge. Die Affinität wurde mit Hilfe einer Kompetitionskurve durch Titration mit des-Arg-BK ermittelt (Gera et al. 1996a). Bei Hunden beträgt die ED₅₀ (effective dose 50%) 0,03±0,01 µg/kg/min (MW±SD), die Halbwertszeit ist >4,5 h (Hanson et al. 1996). Durch intravenöse Infusion von Bradykinin bei Hunden wurde der Effekt des Antagonisten B 9858 auf die hypotensive Bradykinin-Wirkung untersucht. Diese Experimente ergaben, dass B 9858 selektiv für B1-Rezeptoren ist und nicht an B2-Rezeptoren bindet (Hanson et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden 18 µg/kg KG des Antagonisten in PBS (phosphat buffered solution, PBS Dulbecco's, Life Technologies, Karlsruhe) gelöst als Bolus (0,1 ml) 15 Minuten vor der Ischämie intravenös injiziert. Danach wurde den Tieren die osmotische Minipumpe unter die Rückenhaut implantiert. Die Konzentration des in PBS gelösten Antagonisten wurde so gewählt, dass kontinuierlich 300 ng/kg/min des Antagonisten abgegeben wurden. Die osmotische Pumpe wurde bis zum Versuchsende im Tier belassen.

2.5 Bradykinin B2-Rezeptorantagonist CP 0597

Die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors wurde mit dem Antagonisten CP 0597 untersucht. Die Struktur dieses Peptids unterscheidet sich von der Struktur von Bradykinin. An Position 7 ist die Aminosäure Prolin durch D-Tic (1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-3-carboxylsäure) und an Stelle 8 die Aminosäure Phenylalanin durch N-Chg (N-Cyclohexylglycin) ersetzt. Die dadurch bedingte Konformationsänderung gewährleistet eine besonders feste Bindung an den B2- Rezeptor mit einem pK_i von $10,11 \pm 0,11$ ($MW \pm SD$) am Ileum des Meerschweinchens bzw. $9,62 \pm 0,06$ an humanen S34 Klonen (Goodfellow et al. 1996). Außerdem ist der Peptidantagonist gegen seinen Abbau durch Bradykinin-spezifische Proteasen (neutrale Endopeptidase (NEP) und Angiotensin converting enzyme (ACE)) resistent. *In vitro* Stabilitätsuntersuchungen mit verschiedenen Präparationen z.B. humanes Plasma, Rattenniere oder Schweinenieren und -lungen ergaben Halbwertszeiten von CP 0597 von über sechs Stunden. *In vivo* konnte beim Kaninchen eine exzellente Effektivität von CP 0597 am B2-Rezeptor gezeigt werden. Durch Vorbehandlung mit dem Antagonisten wurde die hypotensive Wirkung von Bradykinin verhindert. Dieser Effekt hielt über eine Stunde an. Die ED_{50} war $29,2$ pmol/kg/min. Bei mit LPS (Lipopolysacharid) vorbehandelten Kaninchen wurde auch das Hemmungspotenzial am B1-Rezeptor überprüft, die ED_{50} war hier $1,7$ nmol/kg/min, i.e. etwa das 5000-fache höher als für den B2-Rezeptor (Goodfellow et al. 1996).

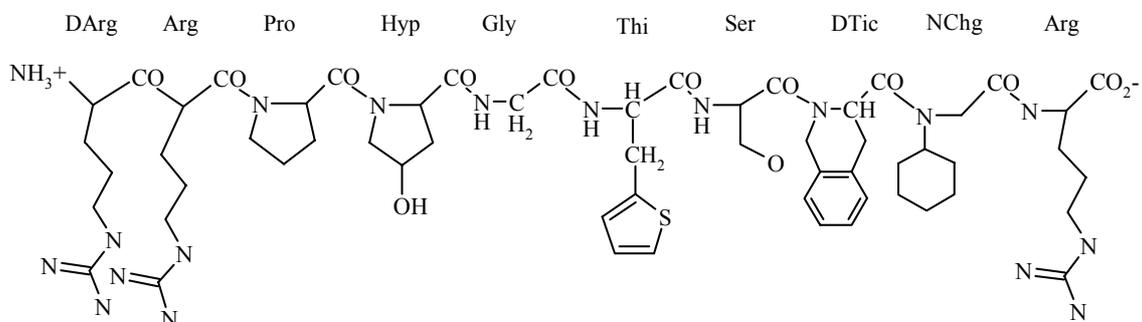


Abbildung 12: Strukturformel von CP 0597

Wie bei dem B1-Antagonisten wurde ein Bolus von 18 µg/kg KG (gelöst in 0,1 ml PBS) 15 Minuten vor Induktion der Ischämie intravenös verabreicht, gefolgt von der kontinuierlichen subkutanen Infusion durch die osmotische Minipumpe von 300 ng/kg/min bis zum Ende des Versuches.

2.6 Bradykinin B1/B2-Rezeptorantagonist B 9430

Zusätzlich zu der selektiven Blockade von B1- und B2-Rezeptoren wurde auch eine gleichzeitige Antagonisierung beider Rezeptoren untersucht. B 9430 ist ein potenter Antagonist beider Rezeptoren, es erübrigte sich daher der Einsatz zweier Rezeptorantagonisten zur gleichen Zeit (Gera et al. 1996b). *In vitro* Versuche haben ein hohes Wirkungspotenzial des Antagonisten sowohl auf den B1- als auch auf den B2-Rezeptor ergeben (Burkard et al. 1996). Bei Hunden ist die hypotensive Wirkung von Bradykinin und des-Arg Bradykinin unter Blockade beider Bradykininrezeptoren durch B 9430 untersucht worden. Dabei wurde eine ED50 von $0,05 \pm 0,01$ µg/kg/min für den B2-Rezeptor und $0,22 \pm 0,13$ µg/kg/min für den B1-Rezeptor gefunden. Vier Stunden nach Beendigung der Infusion des Antagonisten war noch eine blockierende Wirkung auf beide Rezeptorsubtypen nachweisbar (Hanson et al. 1996). Die Effektivität von B 9430 wurde auch an Ratten untersucht. Die einmalige intravenöse Infusion von 10 µg/kg KG des Antagonisten verhinderte die hypotensive Wirkung von Bradykinin (Whalley et al. 1997).

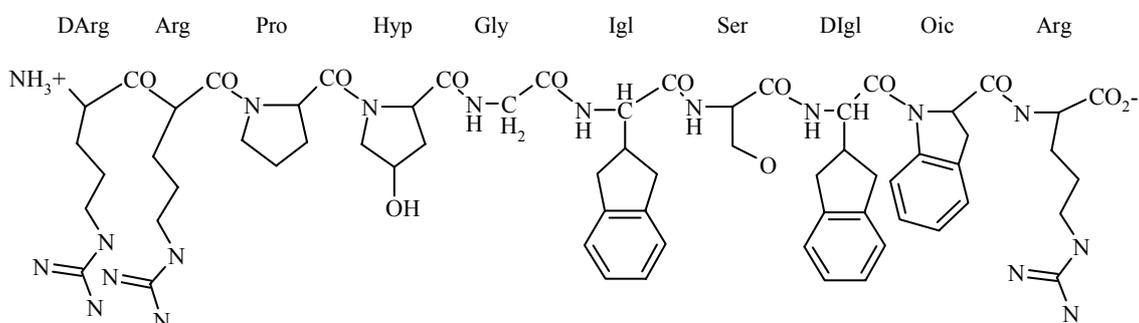


Abbildung 13: Strukturformel von B 9430 (Sejbal et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde B 9430 als Bolus von 18 µg/kg KG 15 Minuten vor der Ischämie infundiert, gefolgt von der subkutanen Infusion mit der osmotischen Minipumpe in einer Dauerdosis von 300 ng/kg/min bis zum Ende des Versuchs am vierten Tag. Anhand der o.e. Befunde kann angenommen werden, dass damit eine vollständige Rezeptorblockade erreicht ist.

2.7 Versuchsgruppen

Zur Untersuchung des PAF-Rezeptorantagonisten WEB 2170 wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Acht Tiere erhielten den Antagonisten in Niedrigdosis (2 mg/kg). Neun Kontrolltiere erhielten nur das Lösungsmittel. Je zehn Tiere bildeten eine Hochdosis-Therapiegruppe (20 mg/kg) und die dazu gehörige Kontrollgruppe mit Lösungsmittel.

Mit ebenfalls je zehn Tieren pro Gruppe wurde das Therapiepotenzial der Bradykinin-Rezeptorantagonisten geprüft, mit der Bildung einer Kontrollgruppe mit Lösungsmittel und Versuchsgruppen mit B2-Antagonist, B1/B2-Antagonist und B1-Antagonist.

Während der zerebralen Ischämie verstorbene Tiere wurden nicht für die Auswertung berücksichtigt. Dies waren 18 Tiere in der Studie mit WEB 2170 in Niedrigdosis, 13 Tiere in der Studie mit WEB 2170 in Hochdosis und fünf Tiere in der Studie mit Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Insgesamt neun Tiere, bei denen bei der Präparation die Dura mater verletzt wurde, mussten ausgeschlossen werden. Vier Gerbils verstarben aus ungeklärter Ursache bei der chirurgischen Präparation. Ein Ausschlusskriterium war schließlich bei einem Tier das Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen bereits vor Induktion der zerebralen Ischämie.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt, das Überleben der Versuchstiere ist als Kaplan-Meier Sterbetafel dokumentiert. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Sigma Stat 2.0 (SPSS Science, Chicago, IL, U.S.A.) durchgeführt. Wegen der limitierten Anzahl der Tiere pro Gruppe wurde davon ausgegangen, dass die Ergebnisse nicht normalverteilt waren. Unterschiede zwischen dem Ausgangswert und folgenden Messungen wurde mit dem Ranksumentest ANOVA nach Friedman getestet. Ergaben sich hier Unterschiede, so wurde weiter mit dem Test nach Dunnet geprüft. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen wurden mit dem Ranksumentest ANOVA nach Kruskal-Wallis geprüft. Ergaben sich hier Unterschiede, so wurde weiter mit dem Dunn-Test bei unterschiedlicher Gruppenstärke und mit dem Dunnet-Test bei gleicher Gruppenstärke getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Analyse der Korrelation zwischen Leukozyten-Endothelinteraktionen und Überlebensdauer oder Neuroscore wurde mit dem Spearman Rank Order Test durchgeführt.

Die statistische Analyse von unterschiedlichen Überlebenszeiten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Statistika für Windows (StatSoft, Inc. (1995), Tulsa, OK, USA) durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen (Versuchsreihe Bradykinin-Antagonisten) wurde zuerst nach Mantel getestet, gefolgt vom Cox-F. Test zum Vergleich zweier Stichproben (Mantel, N. 1966, Cox, D.R. 1972).

3 Ergebnisse

3.1 Platelet-activating factor

3.1.1 Niedrigdosis

3.1.1.1 Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) konnte sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe während der Stabilisierungsphase und der Reperfusion konstant gehalten werden, während der Ischämie hingegen war eine Blutdrucksteigerung zu verzeichnen. Die Konzentration von Halothan im insufflierten Gasgemisch lag während der Stabilisierungsphase bei ca. 0,7 %, der Ischämie um 0,2 % und der Reperfusion um 0,6 %. Die rektale Körpertemperatur konnte unter Verwendung der rückgekoppelten Wärmeplatte genau auf 37,0°C eingestellt werden.

<i>Zeit [min]</i>	<i>-40</i>	<i>-20</i>	<i>-5</i>	<i>I 5</i>	<i>I 10</i>	<i>I 15</i>	<i>5</i>	<i>20</i>	<i>40</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>180</i>
<i>MAP [mmHg]</i>													
<i>Kontrolle</i>	77±2	75±2	73±2	93±4	93±9	97±8	67±4	69±4	71±3	72±2	71±2	71±3	72±3
<i>PAF Ant.</i>	76±2	72±1	73±2	106±5	96±10	90±11	74±1	75±2	74±2	74±3	72±3	72±4	72±4

Tabelle 4: Angabe des MAP [mmHg] in der Kontroll- (n=9) und der Therapiegruppe mit dem PAF-Rezeptorantagonist in Niedrigdosis (n=8) über den gesamten Messzeitraum hinweg, MW ± SEM.

3.1.1.2 Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser von elf Arteriolen und 40 Venolen wurden in neun Versuchstieren der Kontrollgruppe analysiert. In acht Versuchstieren der Therapiegruppe wurden die

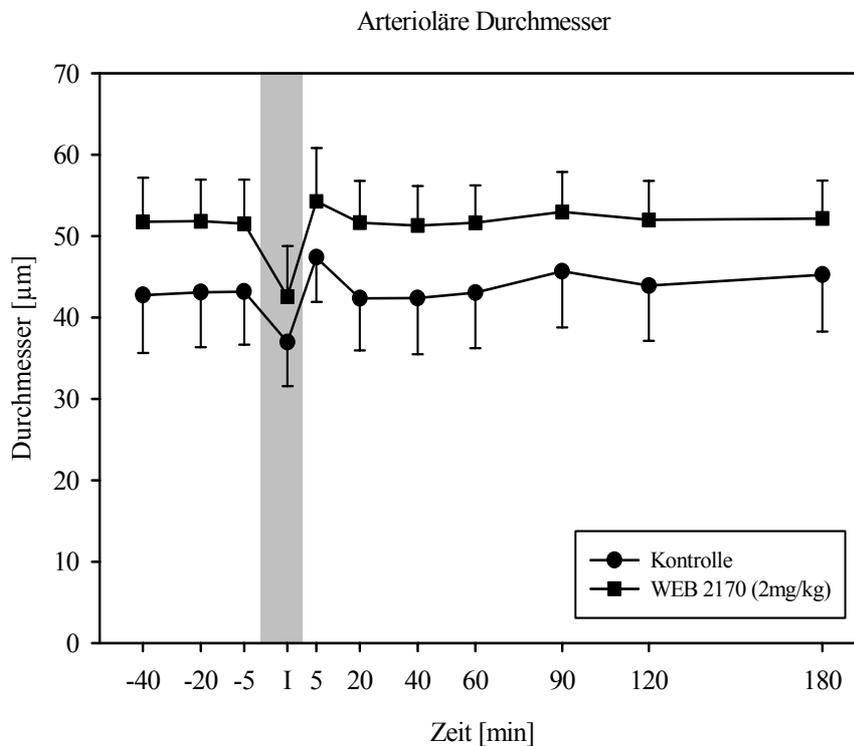


Abbildung 14: Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach der Ischämie ohne und mit Vorbehandlung mit WEB 2170 (2 mg/kg). Die arteriölären Durchmesser verringern sich während der Ischämie geringfügig und erreichen bald wieder Ausgangswerte, sowohl in der Kontroll- als auch der Therapiegruppe. Der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an. $MW \pm SEM$.

Durchmesser von acht Arteriolen und 32 Venolen gemessen. Die arteriölären Durchmesser verringerten sich während der Ischämie geringfügig (nicht signifikant) und erreichten kurz nach der Ischämie wieder Ausgangswerte, dies sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe.

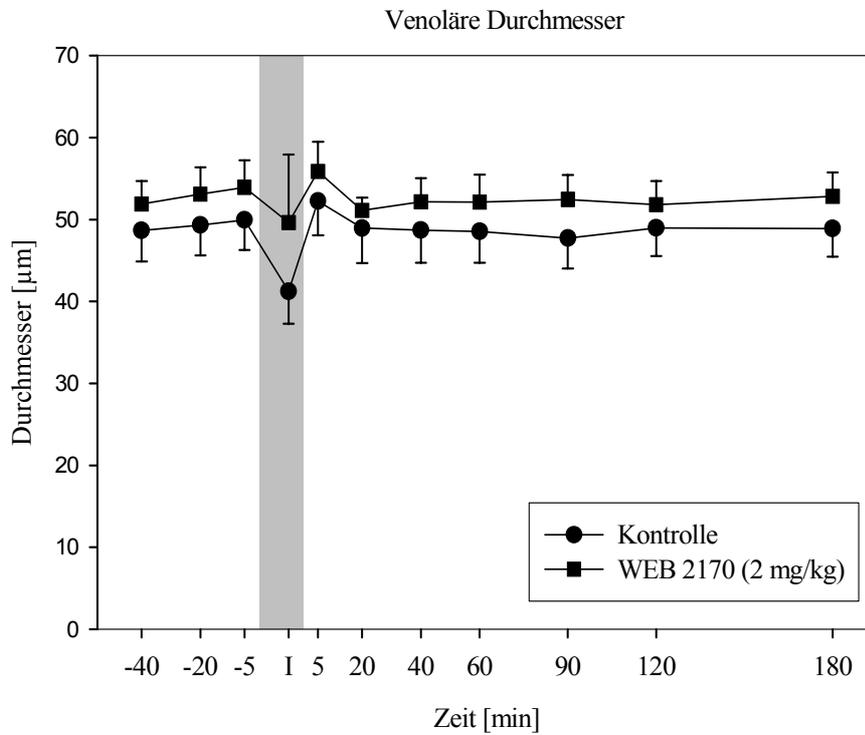


Abbildung 15: Venoläre Durchmesser vor, während und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 (2 mg/kg). Geringe Abnahme der Durchmesser während der Ischämie und Rückkehr auf den Ausgangswert nach der Reperfusion. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. $MW \pm SEM$

3.1.1.3 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Rollen und feste Adhärenz von Leukozyten konnten nur in postkapillären Venolen beobachtet werden. Es wurden in der Kontrollgruppe insgesamt 40 Venolen und in der Therapiegruppe 32 Venolen analysiert. Die Anzahl der am Endothel entlang rollenden Leukozyten stieg während der Reperfusionsphase stetig an und erreichte drei Stunden nach Reperfusionsbeginn in beiden Gruppen ein Maximum mit $18,4 \pm 4,1$ rollenden Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Kontrolle und $29,9 \pm 8,7$ rollenden Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Therapiegruppe. In der Kontrollgruppe war die Anzahl der rollenden

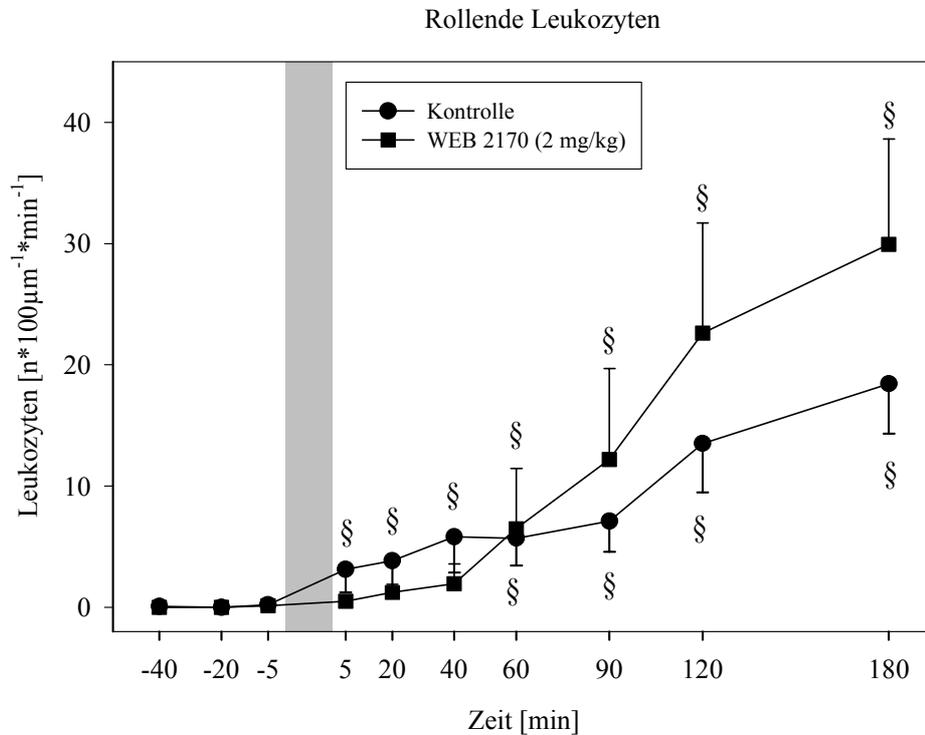


Abbildung 16: Anzahl der am venolären Endothel entlang rollenden Leukozyten vor, während und nach der globalen Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 (2 mg/kg), $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

Leukozyten ab dem Messzeitpunkt fünf Minuten im Vergleich zum Ausgangswert signifikant höher. In der Therapiegruppe war die Anzahl der rollenden Leukozyten ab dem Zeitpunkt 60 Minuten signifikant höher. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Therapiegruppe zeigte sich nicht.

Ein anderes Bild zeigt sich bei der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten. Während in der Kontrollgruppe drei Stunden nach Reperfusion die Anzahl der adhärenen Leukozyten auf $7,1 \pm 4,1 / 100 \times \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ anstieg, wurden in der Therapiegruppe nur $2,6 \pm 1,1 \times 100\mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ fest haftende Leukozyten gefunden. In der Kontrollgruppe ist dieser Anstieg ab fünf Minuten signifikant. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von einander.

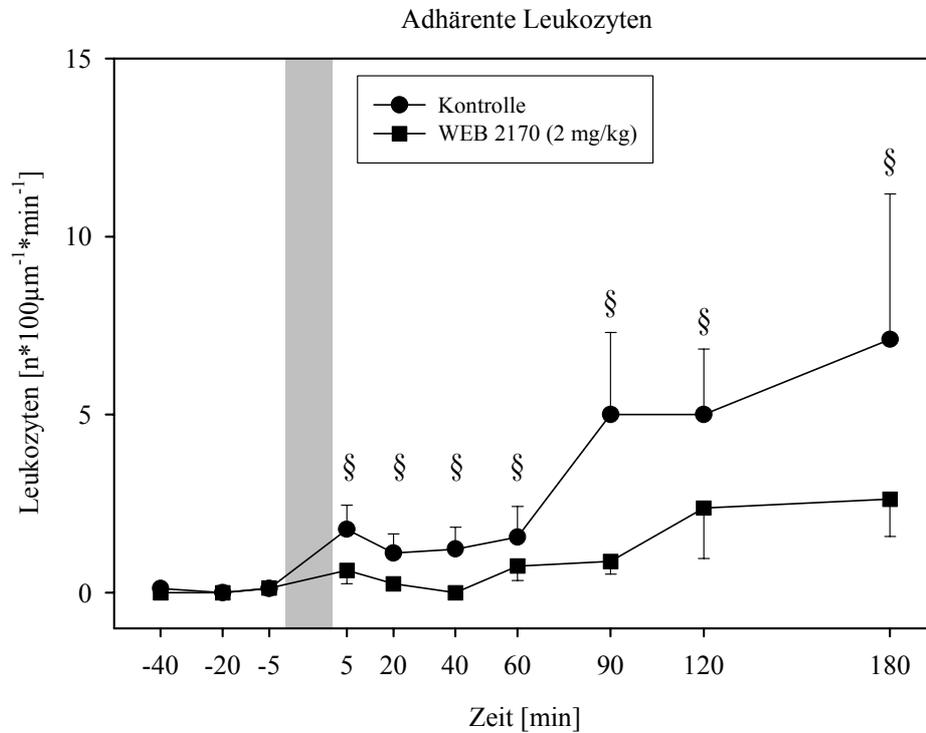


Abbildung 17: Anzahl der am venolären Endothel fest adhärenente Leukozyten vor, während und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 (2 mg/kg). $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert.

3.1.1.4 Mikrovaskuläre Durchblutung

In der Reperfusionphase war der Kehrwert der arterio-venösen Transitzeit als Maß für die mikrovaskuläre Durchblutung in der Reperfusionphase signifikant gegenüber den Ausgangswerten in beiden Gruppen reduziert.

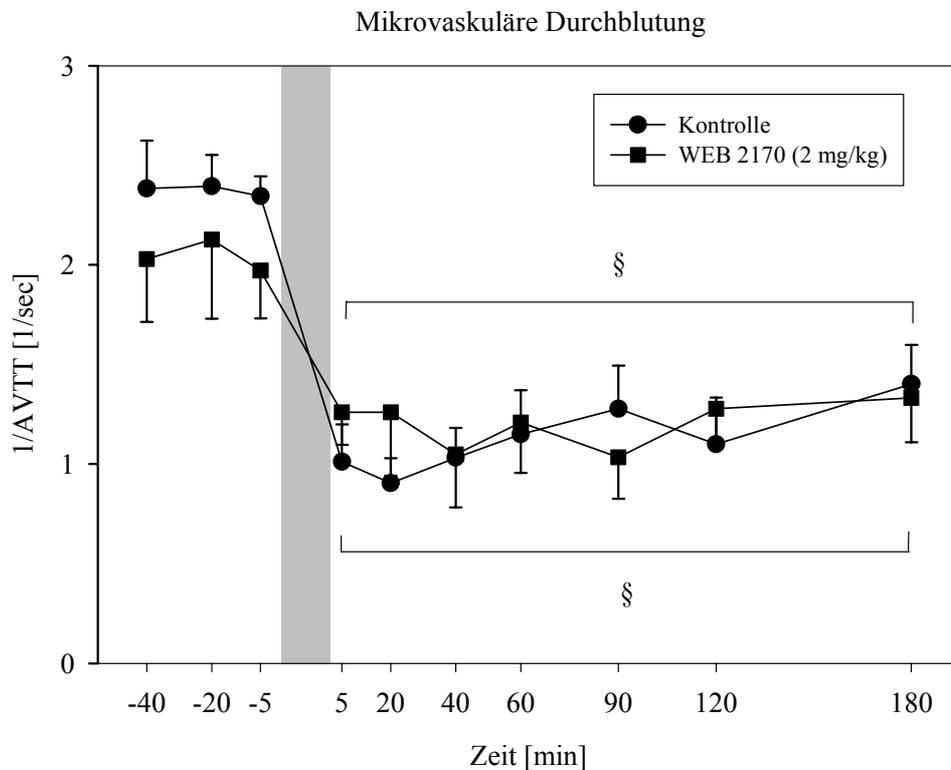


Abbildung 18: Kehrwert der arterio-venösen Transitzeit vor und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 (2 mg/kg) als Maß für die lokale mikrovaskuläre Durchblutung. $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert. In der Reperfusionphase in beiden Gruppen signifikante Reduktion der Durchblutung im Vergleich zum Zeitpunkt 5 min vor der Ischämie.

3.1.1.5 Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht

Alle Versuchstiere, bei denen die Mikrozirkulation in der frühen Reperfusionphase analysiert werden konnte, überlebten den Beobachtungszeitraum von vier Tagen. Beide Gruppen unterschieden sich weder in Bezug auf den Neuroscore noch auf das Körpergewicht, der Verlauf über den Beobachtungszeitraum ist gleich.

Es wurde untersucht, ob zwischen dem neurologischen Defizit, dem Überleben und dem Gewicht und auf der anderen Seite dem Ausmaß von Leukozyten-Endothelinteraktionen

Zusammenhänge bestanden. Die Größen waren von einander unabhängig, ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden.

	<i>Neuroscore [Punkte] Kontrolle</i>	<i>Neuroscore [Punkte] WEB 2170</i>	<i>Gewicht [g] Kontrolle</i>	<i>Gewicht [g] WEB 2170</i>
<i>Vor Ischämie</i>	22,0 ± 0,0	22,0 ± 0,0	66,1 ± 1,4	62,9 ± 1,1
<i>1. Tag</i>	18,3 ± 1,2	19,9 ± 0,9	60,9 ± 1,8	57,7 ± 0,7
<i>2. Tag</i>	20,8 ± 0,5	20,7 ± 0,6	59,1 ± 1,4	57,0 ± 0,9
<i>3. Tag</i>	21,0 ± 0,5	21,1 ± 0,6	59,3 ± 1,7	57,1 ± 1,0
<i>4. Tag</i>	21,8 ± 0,2	21,5 ± 0,4	59,9 ± 1,6	56,6 ± 1,6

Tabelle 5: Neuroscores [Punkte] und Körpergewicht [g] vor der Ischämie sowie vom ersten bis vierten Tag nach Ischämie. MW ± SEM. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.1.6 Histomorphometrie

Sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe wurden in je acht Gehirnen vitale Nervenzellen histomorphologisch ausgewertet. In den Gehirnen der Therapiegruppe ist in allen Hirnregionen ein Trend zu höherer Nervenzellichte zu erkennen, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

<i>Hirnareal/Region</i>	<i>Kontrolle [n/mm²]</i>	<i>WEB 2170 [n/mm²]</i>
<i>CA 1</i>	668 ± 236	798 ± 282
<i>CA 2</i>	291 ± 103	380 ± 134
<i>CA 3</i>	315 ± 111	358 ± 126
<i>CA 3/4</i>	420 ± 148	543 ± 192
<i>Parietaler Kortex Schicht 1</i>	203 ± 72	240 ± 85
<i>Parietaler Kortex Schicht 2</i>	226 ± 80	274 ± 97
<i>Parietaler Kortex Schicht 3</i>	168 ± 59	253 ± 89
<i>Parietaler Kortex Schicht 4</i>	168 ± 59	256 ± 91
<i>Striatum</i>	204 ± 72	224 ± 79
<i>Frontaler Kortex Schicht 1</i>	215 ± 76	219 ± 77
<i>Frontaler Kortex Schicht 2</i>	232 ± 82	273 ± 96
<i>Frontaler Kortex Schicht 3</i>	186 ± 66	213 ± 75
<i>Frontaler Kortex Schicht 4</i>	186 ± 66	250 ± 88

Tabelle 6: Zelldichte [n/mm²] vitaler Nervenzellen in unterschiedlichen Hirnarealen bestimmt am vierten Tag nach der globalen zerebralen Ischämie mit (n=8) und ohne (n=8) Vorbehandlung mit WEB 2170 in Niedrigdosis (2 mg/kg), MW ± SEM.

3.1.2 Hochdosis

In der Versuchsreihe zum PAF-Antagonisten WEB 2170 in Hochdosis wurden sowohl in der Kontroll- als auch der Therapiegruppe je zehn Tiere untersucht.

3.1.2.1 Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) konnte sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe während der Stabilisierungsphase und der Reperfusion konstant gehalten werden, während der Ischämie hingegen war eine Blutdrucksteigerung zu verzeichnen. Die Konzentration von Halothan im insufflierten Gasgemisch lag während der Stabilisierungsphase bei ca. 0,8 %, der Ischämie um 0,4 % und der Reperfusion um 0,6 %.

Die rektale Körpertemperatur konnte unter Verwendung der rückgekoppelten Wärmeplatte genau auf 37,0°C eingestellt werden.

<i>Zeit [min]</i>	<i>-40</i>	<i>-20</i>	<i>-5</i>	<i>I 5</i>	<i>I 10</i>	<i>I 15</i>	<i>5</i>	<i>20</i>	<i>40</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>180</i>
<i>MAP [mmHg]</i> <i>Kontrolle</i>	72±2	70±2	70±2	105±3	109±5	106±7	71±3	68±2	67±2	66±3	66±3	65±3	60±3
<i>MAP [mmHg]</i> <i>PAF Ant.</i>	73±2	75±2	71±3	90±4	96±6	89±6	70±4	69±3	71±3	66±3	68±2	68±2	67±2

Tabelle 7: Angabe des MAP [mmHg] in der Kontrolle (n=10) und der Gruppe mit dem PAF-Rezeptorantagonist in Hochdosis (n=10) über den gesamten Messzeitraum hinweg, MW ± SEM.

3.1.2.2 Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser von je einer Arteriole pro Versuchstier wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten analysiert. In der Kontrollgruppe wurden die Durchmesser von insgesamt 45 und in der Gruppe mit der Behandlung von 50 Venolen bestimmt. Der Durchmesser der Arteriolen ist in der Kontrollgruppe sowohl während der Ischämie wie auch während der Reperfusionphase signifikant gegenüber dem Ausgangswert vermindert. In der Therapiegruppe konnte eine signifikante Reduktion des arteriolen Durchmessers hingegen nur während der Ischämie beobachtet werden. Die beiden Gruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt voneinander. Die statistische Analyse der Durchmesser der Venolen ergab, dass in der Kontrollgruppe der Durchmesser während der Ischämie gegenüber dem Ausgangswert fünf Minuten vor der Ischämie signifikant vermindert war, fünf Minuten nach dem Reperfusionbeginn signifikant vergrößert war und im folgenden wieder unter die Ausgangswerte abfiel. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert wurde in der Therapiegruppe nicht beobachtet. Es lag kein Unterschied zwischen den Gruppen vor.

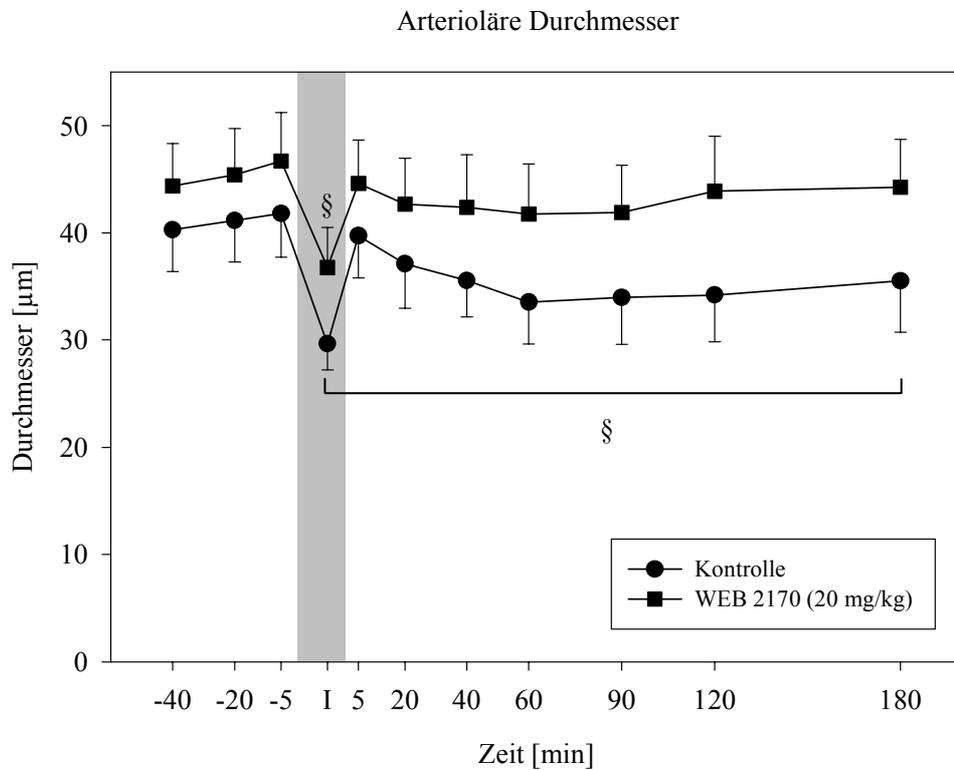


Abbildung 19: Durchmesser der Arteriolen vor, während und nach der Ischämie in der Kontrollgruppe sowie der Gruppe mit Hochdosistherapie WEB 2170 (20 mg/kg), § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert, $MW \pm SEM$.

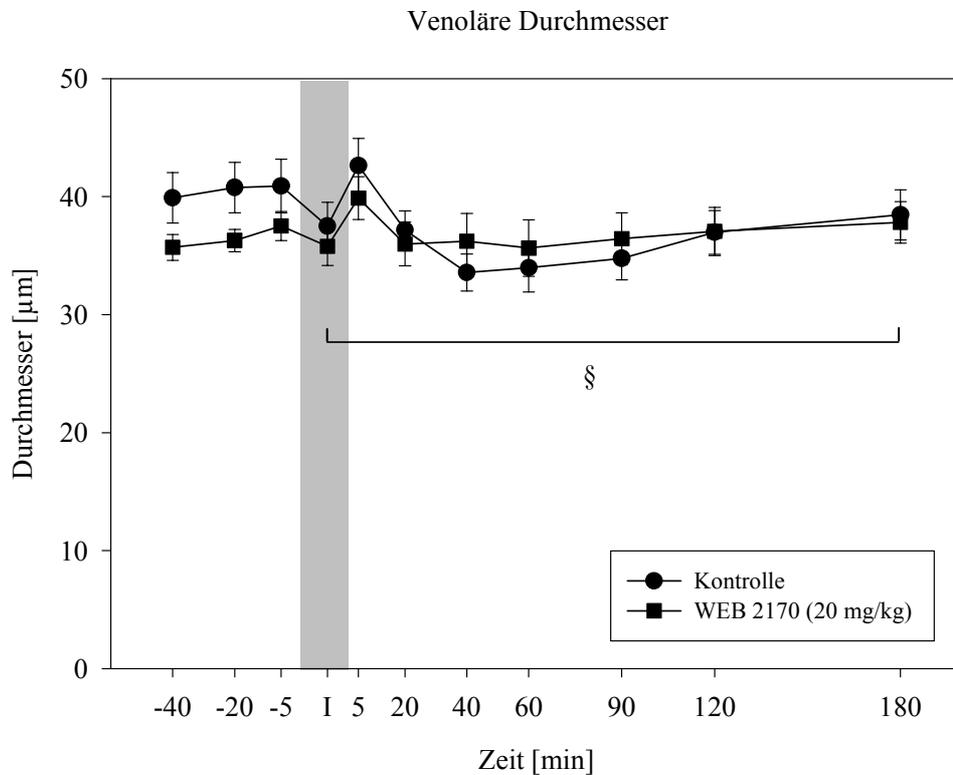


Abbildung 20: Durchmesser der Venolen vor, während und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg). Der Durchmesser der Venolen war während der Ischämie signifikant reduziert, 5 min nach Beginn der Reperfusion vergrößert und im folgenden wiederum signifikant reduziert im Vergleich zum Ausgangswert. In der Therapiegruppe ergab sich kein Unterschied. § $p > 0,05$ vs. Ausgangswert der Kontrollgruppe.

3.1.2.3 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Rollen und feste Adhärenz von Leukozyten konnte nur in postkapillären Venolen beobachtet werden. Es wurden in der Kontrollgruppe insgesamt 45 Venolen und in der Therapiegruppe 50 Venolen analysiert. Die Anzahl der am Endothel entlang rollenden Leukozyten stieg während der Reperfusionsphase stetig an und erreichte drei Stunden nach Reperfusionsbeginn in beiden Gruppen ein Maximum mit $21 \pm 6,8$ rollenden Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}$ in der Kontrolle und $4,9 \pm 2,0$ rollenden Leukozyten $/100 \mu\text{m} \times \text{min}$ in

Rollende Leukozyten

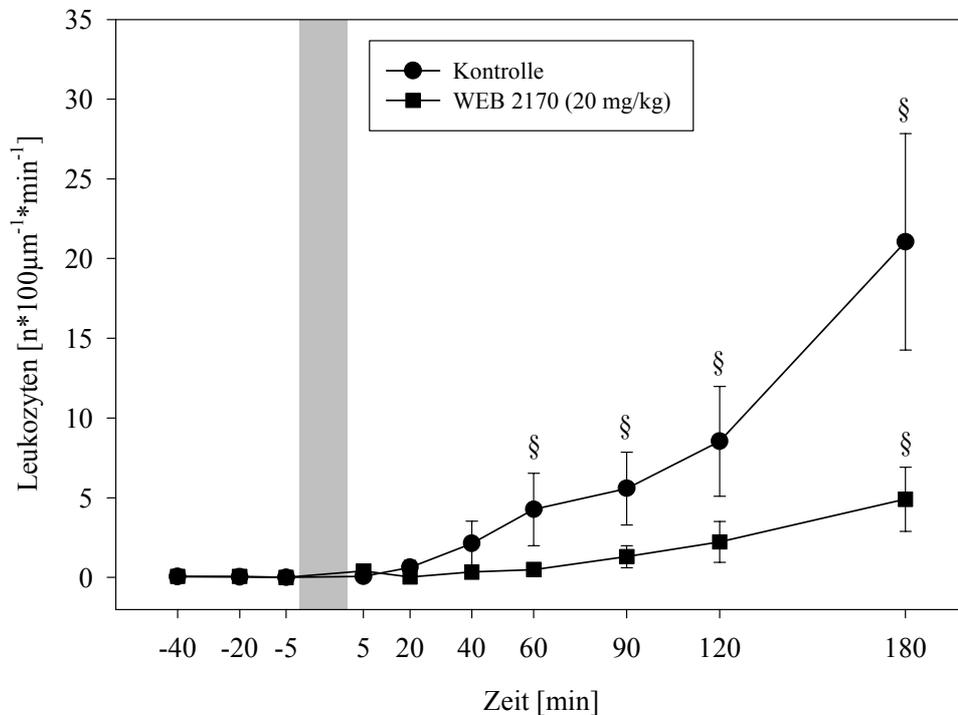


Abbildung 21: Anzahl der am venulären Endothel entlang rollenden Leukozyten vor und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg), § $p < 0,05$ vs Ausgangswert. Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. $MW \pm SEM$.

der Therapiegruppe. Die Anzahl der rollenden Leukozyten war ab dem Messzeitpunkt 60 Minuten signifikant höher als der Ausgangswert. In der Therapiegruppe war die Anzahl der rollenden Leukozyten zum Zeitpunkt 180 min signifikant höher. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Therapiegruppe lag nicht vor. Ein anderes Bild ergab die Analyse der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten. Während in der Kontrollgruppe drei Stunden nach Reperfusion die Anzahl der adhärenen Leukozyten auf $6,0 \pm 2,0 \times 100\mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ anstieg, wurden in der Therapiegruppe nur $0,6 \pm 0,2$ fest haftende Leukozyten $\times 100\mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ gefunden. Der statistische Vergleich beider Gruppen miteinander ergab, dass die Therapie die feste Adhärenz zum Zeitpunkt 180 Minuten nach Reperfusionbeginn reduzierte. In der Kontrollgruppe ist der Anstieg ab 60 Minuten

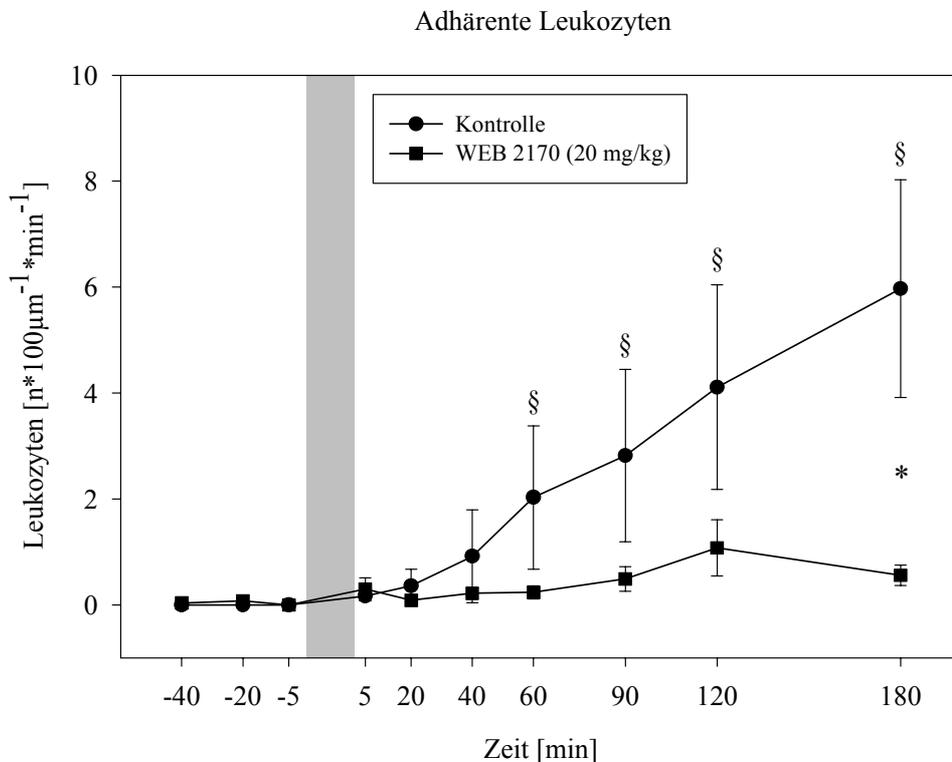


Abbildung 22: Adhärenente Leukozyten vor und nach der Ischämie mit und ohne WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg). Die Anzahl fest adhärenenter Leukozyten stieg in der Kontrollgruppe ab dem Zeitpunkt 60 min auf signifikante Werte an, wohingegen kein signifikanter Anstieg in der Therapiegruppe zu beobachten war. Zum Zeitpunkt 180 min war die feste Adhärenz in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert 5 min vor der Ischämie, * $p < 0,05$ Kontroll- vs. Therapiegruppe, $MW \pm SEM$.

signifikant im Vergleich zum Ausgangswert, jedoch ist keine Signifikanz in der Therapiegruppe zu erkennen.

3.1.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Die Analyse der funktionellen Kapillardichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ergab, dass während der Ischämie kaum noch eine Kapillardurchblutung feststellbar war

Funktionelle Kapillardichte

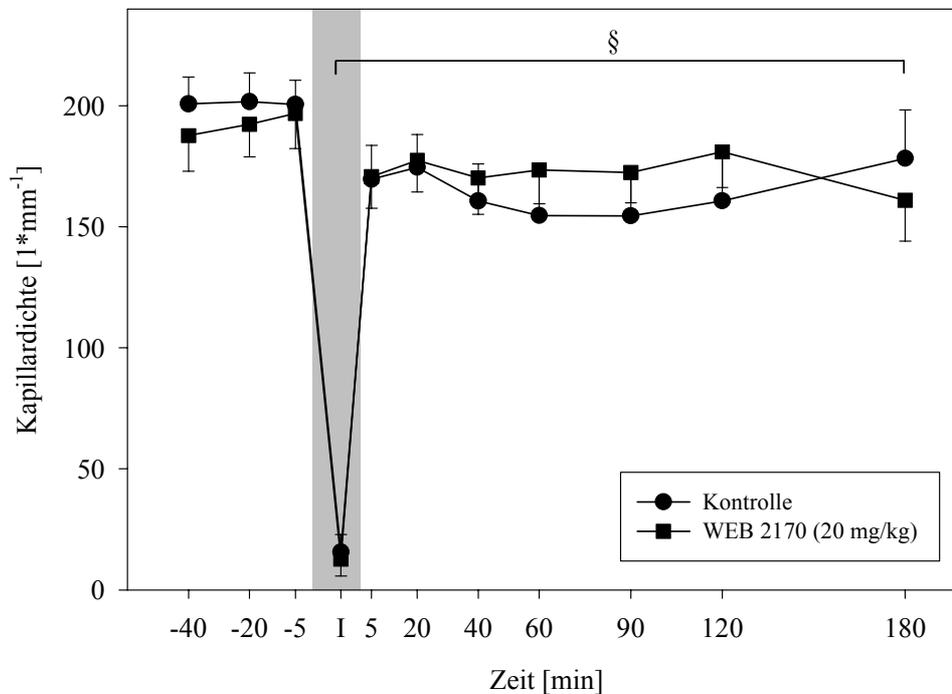


Abbildung 23: Die funktionelle Kapillardichte war während der Ischämie und der Reperfusion in den Gruppen mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg) signifikant zum Ausgangswert 5 min vor der Ischämie vermindert. § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert, $MW \pm SEM$.

und die Werte gegen Null strebten. Während der Reperfusionsphase war die Kapillardichte in beiden Gruppen signifikant im Vergleich zum Ausgangswert reduziert, wobei eine Reduktion um etwa 10% vorlag. Es wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet.

3.1.2.5 Mikrovaskuläre Durchblutung

Die Messung der arterio-venösen Transitzeit als Maß für die lokale mikrovaskuläre Durchblutung ergab, dass während der Reperfusionsphase die Durchblutung gegenüber

dem Ausgangswert signifikant vermindert war. Hierbei war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen.

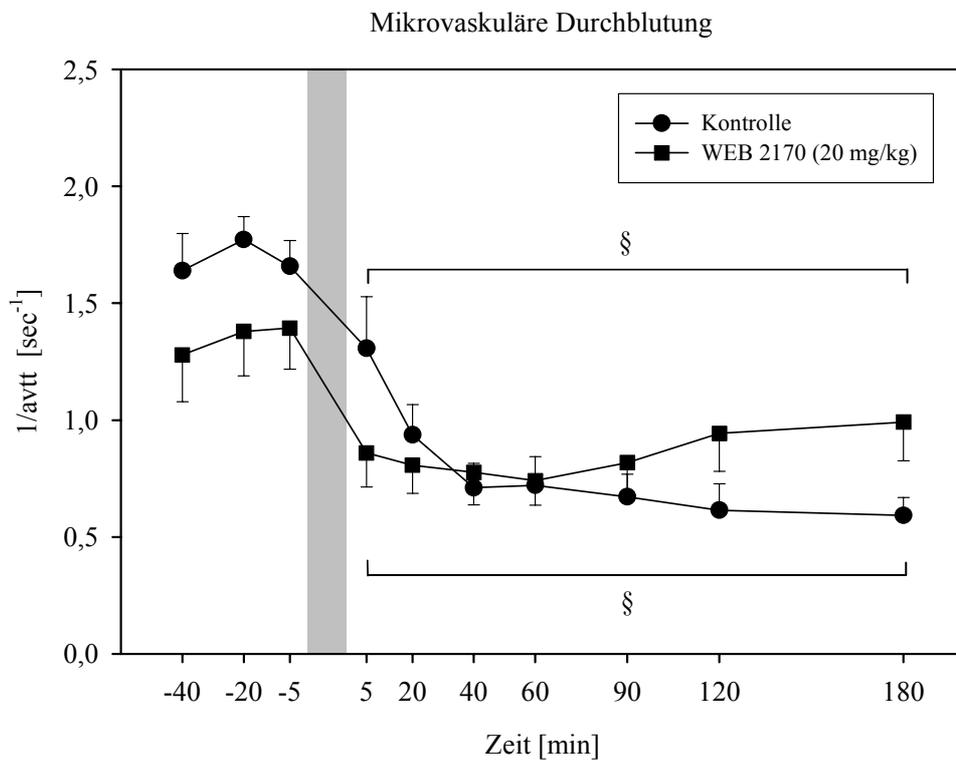


Abbildung 24: Mikrovaskuläre Perfusion vor und nach der Ischämie mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg). § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert, MW \pm SEM.

3.1.2.6 Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht

Der Neuroscore in der Kontrolle sank im Laufe der vier Tage der Beobachtungsphase von 22 Punkten auf $15,4 \pm 3,4$ ab (nicht signifikant). In der mit WEB 2170 behandelten Gruppe sank der Neuroscore auf $4,9 \pm 2,1$ Punkte ab; dies ist im Vergleich zum Ausgangswert signifikant. Am vierten postischämischen Tag unterscheidet sich die Kontrollgruppe von der Therapiegruppe signifikant.

Die Tiere beider Gruppen verloren in der Zeit nach der Ischämie an Gewicht, wobei sich die Gruppen nicht von einander unterschieden.

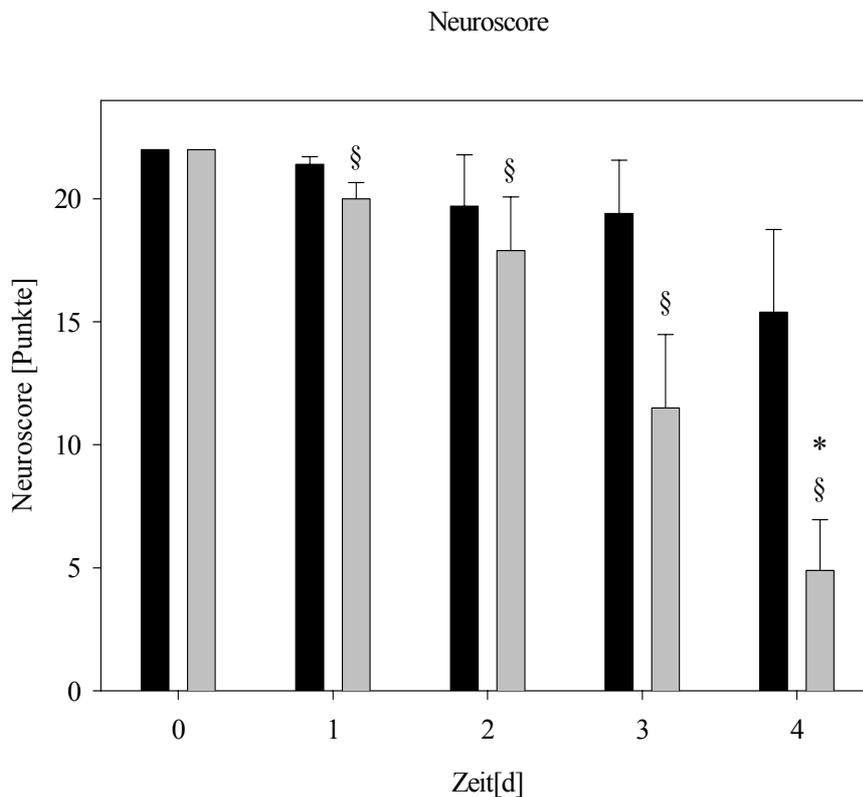


Abbildung 25: Entwicklung des Neuroscores in der Kontrollgruppe (schwarz) und der Therapiegruppe (grau) vom Zeitpunkt vor der Ischämie sowie vom ersten bis vierten Tage nach der Ischämie. § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert, * $p < 0,05$ Therapie- vs. Kontrollgruppe, $MW \pm SEM$.

Ein Tier aus der Kontrollgruppe verstarb am dritten Tag nach der Ischämie, zwei weitere am vierten Tag. Ein Tier der Therapiegruppe verstarb am zweiten Tag nach der Ischämie, drei am dritten und zwei am vierten Tag. Bei der statistischen Analyse der Überlebenszeiten ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen herausfinden.

Es wurde untersucht, ob zwischen dem neurologischen Defizit, dem Überleben und dem Gewicht und auf der anderen Seite dem Ausmaß von Leukozyten-Endothelinteraktionen

Zusammenhänge bestanden. Die Größen waren voneinander unabhängig, ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden.

	<i>Gewicht [g] Kontrolle</i>	<i>Gewicht [g] WEB 2170</i>
<i>Vor Ischämie</i>	65,9 ± 1,5	66,6 ± 1,8
<i>1. Tag</i>	59,4 ± 1,4	60,5 ± 1,1
<i>2. Tag</i>	56,4 ± 1,3	57,0 ± 1,3
<i>3. Tag</i>	56,3 ± 1,5	54,8 ± 1,6
<i>4. Tag</i>	56,7 ± 1,6	50,5 ± 1,8

Tabelle 8: Körpergewicht [g] der Tiere mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg) vor der Ischämie sowie vom ersten bis vierten Beobachtungstag. Es ist kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen. MW ± SEM.

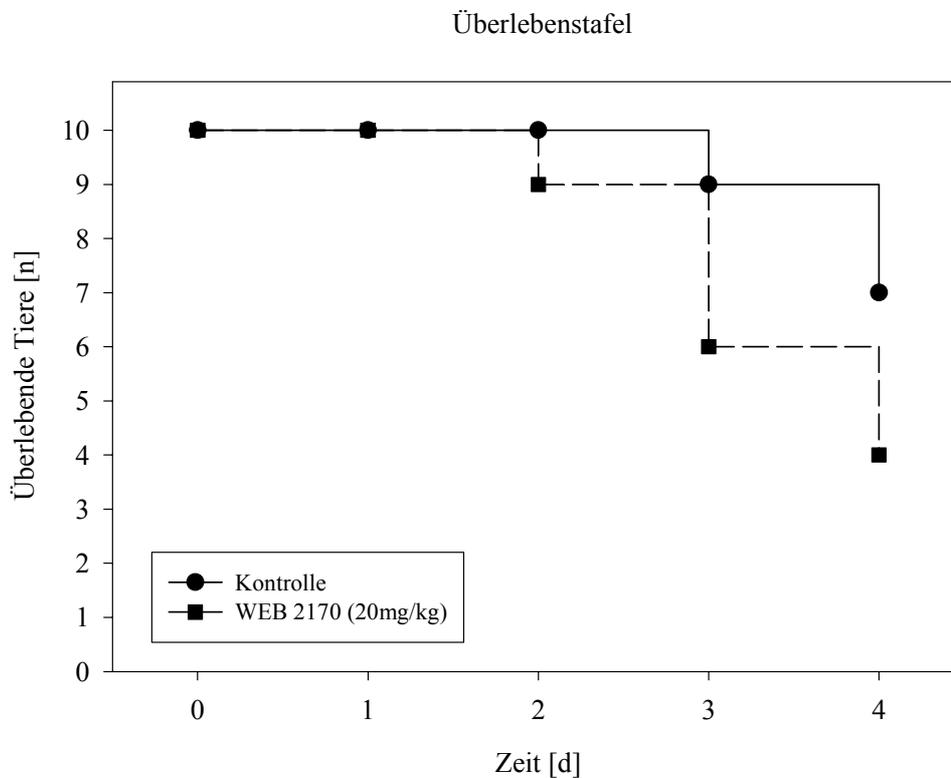


Abbildung 26: Kaplan-Meier Überlebenskurve der Gruppen mit und ohne Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg).

3.1.2.7 Histomorphometrie

Es konnten in der Kontrollgruppe sieben Gehirne in die histomorphometrische Auswertung eingehen, in der Therapiegruppe waren es vier Gehirne. Im Vergleich beider Gruppen miteinander zeigt sich ein heterogenes Bild, es ist kein eindeutiger Trend in Richtung therapeutischer Effektivität oder Ineffektivität zu erkennen.

<i>Hirnareal/Region</i>	<i>Kontrolle [n/mm²]</i>	<i>WEB 2170 [n/mm²]</i>
<i>CA 1</i>	854 ± 57	662 ± 132
<i>CA 2</i>	395 ± 83	353 ± 107
<i>CA 3</i>	414 ± 47	476 ± 53
<i>CA 3/4</i>	388 ± 31	422 ± 35
<i>Parietaler Kortex Schicht 1</i>	312 ± 46	340 ± 39
<i>Parietaler Kortex Schicht 2</i>	992 ± 112	959 ± 156
<i>Parietaler Kortex Schicht 3</i>	453 ± 61	492 ± 70
<i>Parietaler Kortex Schicht 4</i>	678 ± 97	605 ± 95
<i>Striatum</i>	379 ± 23	381 ± 33
<i>Frontaler Kortex Schicht 1</i>	266 ± 40	248 ± 77
<i>Frontaler Kortex Schicht 2</i>	278 ± 63	282 ± 47
<i>Frontaler Kortex Schicht 3</i>	246 ± 15	210 ± 27
<i>Frontaler Kortex Schicht 4</i>	485 ± 37	431 ± 66

Tabelle 9: Zelldichte [n/mm²] vitaler Nervenzellen in unterschiedlichen Hirnarealen bestimmt am vierten Tag nach der globalen zerebralen Ischämie mit (n=4) und ohne (n=7) Vorbehandlung mit WEB 2170 in Hochdosis (20 mg/kg), MW ± SEM.

3.2 Bradykinin

Bei der Planung der Studie mit Bradykininantagonisten stellte sich die Frage, ob mongolische Wüstenrennmäuse überhaupt über ein Kallikrein/Kinin-System verfügen. In der Literatur konnte keine Angabe gefunden werden, ob an dieser Spezies Untersuchungen über Bradykinin durchgeführt worden waren. Es wurde daher nach einem möglichst einfachen Experiment gesucht, das zur Klärung dieser Fragestellung beitragen konnte. An drei Gerbils wurde untersucht, ob die intravenöse Injektion von Bradykinin zu einer Vasodilatation und infolge zu Hypotension führt. Bei allen Tieren wurde kurzfristig ein massiver Blutdruckabfall von wenigen Minuten nach jeder Bradykinininjektion beobachtet. Diese Hypotension war dosisabhängig.

3.2.1 Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur

Der mittlere arterielle Blutdruck lag kurz vor Induktion der Ischämie in den vier Versuchsgruppen zwischen 65 und 70 mmHg. Die Infusion der Rezeptorantagonisten 15 Minuten vor Induktion der Ischämie, also zwischen dem Messzeitpunkt -20 Minuten und -5 Minuten, hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck. Während der Ischämie konnte ein erhöhter Blutdruck in allen vier Gruppen beobachtet werden. Bereits kurz nach Reperfusionbeginn kehrte dieser wieder auf Ausgangswerte zurück. Die Gruppen unterscheiden sich nicht von einander. Die Narkostiefe, d.h. die Konzentration von Halothan in dem insufflierten Gasgemisch, war ebenfalls bei allen Tieren gleich. Vor der Ischämie lag die Konzentration im Mittel bei 0,9 %, während der Ischämie bei 0,4 % und zur Zeit der Reperfusion bei 0,7 %. Es war möglich, die Körpertemperatur über den gesamten Versuchszeitraum hinweg konstant bei 37°C zu halten.

<i>Zeit [min]</i>	<i>-40</i>	<i>-20</i>	<i>-5</i>	<i>I 5</i>	<i>I 10</i>	<i>I 15</i>	<i>5</i>	<i>20</i>	<i>40</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>180</i>
<i>MAP [mmHg]</i> <i>Kontrolle</i>	73±1	75±1	70±1	99±2	89±3	84±3	72±1	70±1	69±1	69±1	68±1	67±1	66±1
<i>MAP [mmHg]</i> <i>B2-Ant.</i>	72±1	73±0	68±0	105±1	102±2	89±2	68±1	69±1	69±1	70±1	68±1	68±1	67±1
<i>MAP [mmHg]</i> <i>B1/B2-Ant.</i>	74±0	73±0	68±1	90±3	95±1	82±1	68±1	68±1	70±1	69±1	67±1	68±1	67±1
<i>MAP [mmHg]</i> <i>B1-Ant.</i>	73±1	71±1	65±1	94±1	84±1	71±1	63±1	65±1	65±1	65±1	67±1	66±1	65±1

Tabelle 10: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), MW ± SEM.

3.2.2 Gefäßdurchmesser

In jeder Gruppe wurden die Gefäßdurchmesser von jeweils zehn Arteriolen zu jedem Messzeitpunkt analysiert. 45 Venolen in der Kontrolle und je 42 Venolen in den Therapiegruppen wurden untersucht.

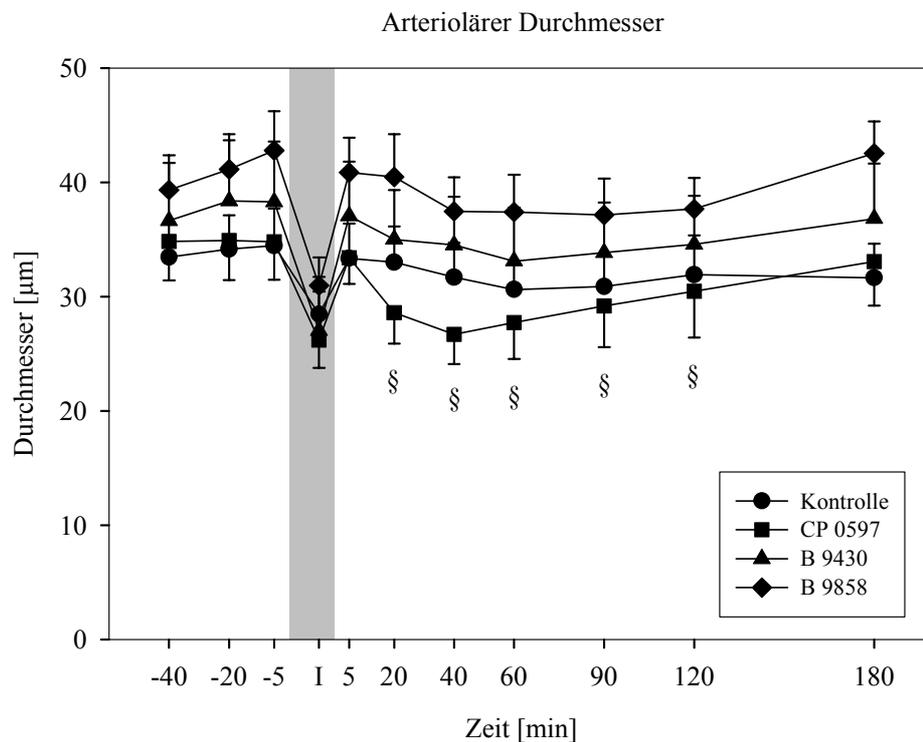


Abbildung 27: Arteriöler Durchmesser in der Kontroll- und den drei Therapiegruppen. § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert, der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an, $MW \pm SEM$.

Während der Ischämie konnte eine Verringerung der Gefäßdurchmesser der Arteriolen beobachtet werden, die mit Ausnahme der mit dem B2-Antagonisten vorbehandelten Tiere wieder auf die Ausgangswerte anstieg. In der Gruppe mit dem B2-Antagonisten fanden

sich signifikant verringerte Durchmesser im Vergleich zum Ausgangswert fünf Minuten vor Induktion der Ischämie, zu den Zeitpunkten 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten.

Die Durchmesser der Venolen waren ebenfalls während der Ischämie verringert. Kurz nach Reperfusionbeginn kehrten sie wieder auf Ausgangswerte zurück. 20 Minuten nach Reperfusionbeginn kam es zu einer Abnahme der Gefäßdurchmesser, die in der Kontroll-, der B2-Antagonisten- und der B1/B2-Antagonistengruppe im Vergleich zum Ausgangswert Signifikanz erreichte. In der B1-Antagonistengruppe war dies zu den

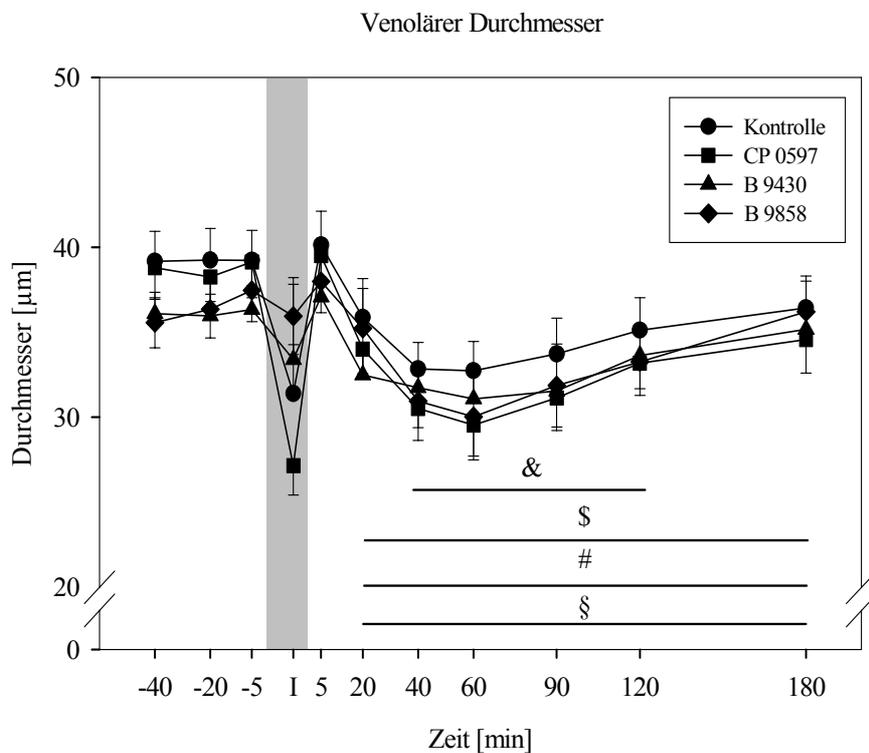


Abbildung 28: Venoläre Durchmesser in der Kontroll- und den drei Therapiegruppen, $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B2-Antagonistengruppe (CP 0597), § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1/B2-Antagonistengruppe (B 9430), & $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1-Antagonistengruppe (B 9858). Der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an.

Zeitpunkten 40, 60, 90 und 120 Minuten der Fall. Ein Unterschied zwischen den vier Gruppen war nicht nachweisbar.

3.2.3 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Das Rollen und die feste Adhärenz von Leukozyten wurden in postkapillären Venolen analysiert. Dazu wurden in der Kontrollgruppe 42 und in den Therapiegruppen jeweils 45 Venolen zu jedem Messzeitpunkt untersucht.

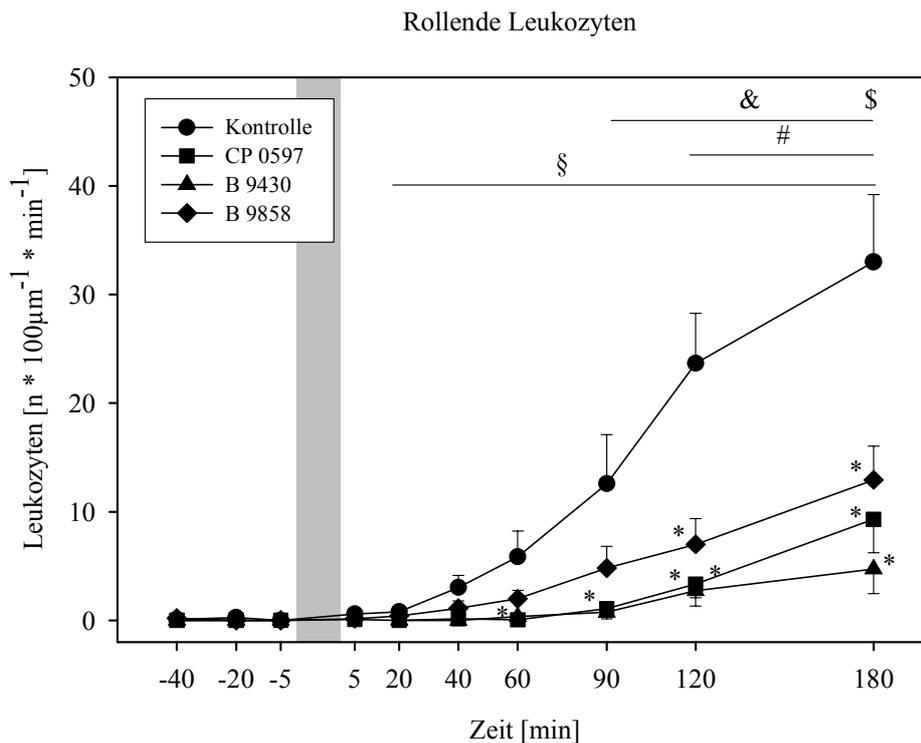


Abbildung 29: Anzahl der am Endothel entlang rollenden Leukozyten, * $p < 0,05$ Kontrolle vs. Therapiegruppen, $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B2-Antagonistengruppe (CP 0597), \$ $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1/B2-Antagonistengruppe (B 9430), & $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1-Antagonistengruppe (B 9858), * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. Der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an.

In der Kontrollgruppe stieg die Anzahl der am Endothel entlang rollenden Leukozyten bereits ab dem Zeitpunkt 20 Minuten nach Reperfusionbeginn signifikant kontinuierlich an und erreichte nach drei Stunden zum Versuchsende mit $33,0 \pm 6,2$ Leukozyten $\times 100\mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ihr Maximum. Die Gruppe, die mit dem B2-Antagonisten behandelt wurde, zeigte eine Hemmung des Rollens. Erst zum Zeitpunkt 120 Minuten ist der Anstieg signifikant zum Ausgangswert. Zu den Zeitpunkten 60, 90, 120 und 180 Minuten war der Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. Die Anzahl rollender Leukozyten in der B1/B2-Antagonistengruppe stieg während der Reperusionsphase an und erreichte signifikante Werte zum Zeitpunkt 180 Minuten. Eine signifikante Hemmung des Rollens im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten beobachtet werden. Auch die Applikation des B1-Antagonisten führte zu einer Hemmung des Leukozytenrollens. Signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe lag der Wert zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten. Im Vergleich zum Ausgangswert konnte ein vermehrtes Rollen zu den Zeitpunkten 90, 120 und 180 Minuten gemessen werden.

Die Anzahl der am Endothel fest adhärenen Leukozyten stieg in der Kontrollgruppe in der Reperusionsphase kontinuierlich an. Zu den Zeitpunkten 60, 90, 120 und 180 Minuten ist dieser Anstieg signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Es zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Anzahl fest adhärenen Leukozyten in der Gruppe mit dem B2-Antagonisten. Allerdings ist dieser erst zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten signifikant höher als der Ausgangswert. Der B2-Antagonist führte zu einer Hemmung der festen Adhärenz im Vergleich zur Kontrollgruppe, die zu den Zeitpunkten 60, 90, 120 und 180 Minuten signifikant war. In der Gruppe, die mit dem B1/B2-Antagonisten vorbehandelt wurde, kam es zu einem leichten Anstieg der festen Adhärenz, der allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant war. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte, dass die Hemmung der festen Adhärenz zum Zeitpunkt 180 Minuten signifikante Werte erreichte. Der kontinuierliche Anstieg der Adhärenz in der B1-Antagonistengruppe war zu den Zeitpunkten 90, 120, 180 Minuten signifikant höher als der Ausgangswert. Zu den Zeitpunkten 120 und 180 Minuten war die Verringerung dieser Form der Leukozyten-Endothelinteraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant.

Adhärente Leukozyten

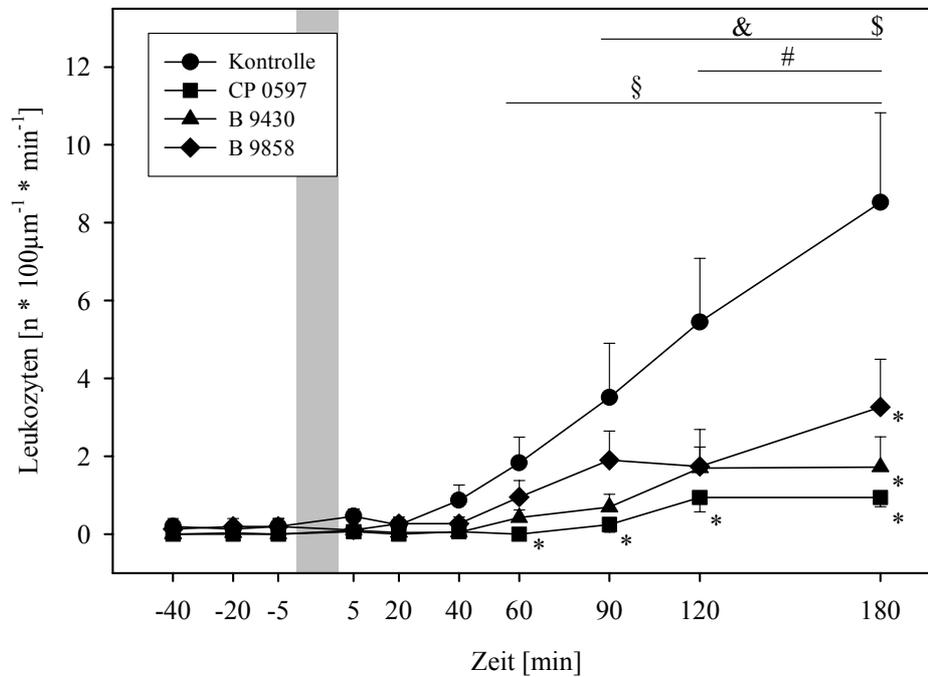


Abbildung 30: Anzahl der am Endothel fest adhärenen Leukozyten, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ Kontrolle vs. Therapiegruppen, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B2-Antagonistengruppe (CP 0597), \$ $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1/B2-Antagonistengruppe (B 9430), & $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1-Antagonistengruppe (B 9858), der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an.

3.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte konnte in der Kontroll- und der B2-Antagonistengruppe bei allen zehn Versuchstieren und in der B1- und B1/B2-Antagonistengruppe bei neun Versuchstieren erfasst werden. Bei jeweils einem Tier dieser Versuchsgruppen war es wegen mangelnder Bildqualität schon in der Kontrollphase nicht möglich, diesen Parameter zu erfassen. Die Analyse der funktionellen Kapillardichte zeigte, dass es in allen Versuchsgruppen während der frühen Reperfusionphase, d. h. bis zu 180 Minuten nach Reperfusionbeginn zu einer leichten Abnahme der Kapillarperfusion kam,

die allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant war. Die Gruppen unterschieden sich nicht von einander.

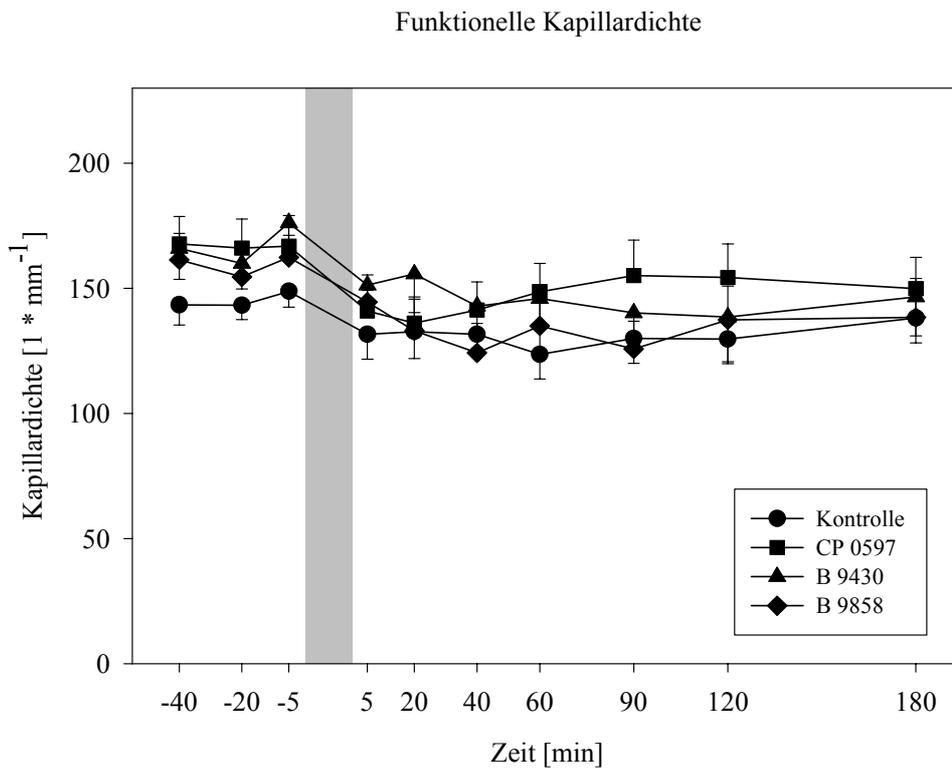


Abbildung 31: Funktionelle Kapillardichte vor und nach der Ischämie, kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen. $MW \pm SEM$.

3.2.5 Mikrovaskuläre Durchblutung

Während der Reperfusionphase kam es zu einer signifikanten Abnahme der mikrovaskulären Durchblutung in allen vier Versuchsgruppen, die konstant über die gesamte frühe Reperfusionphase anhielt. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht von einander.

Mikrovaskuläre Durchblutung

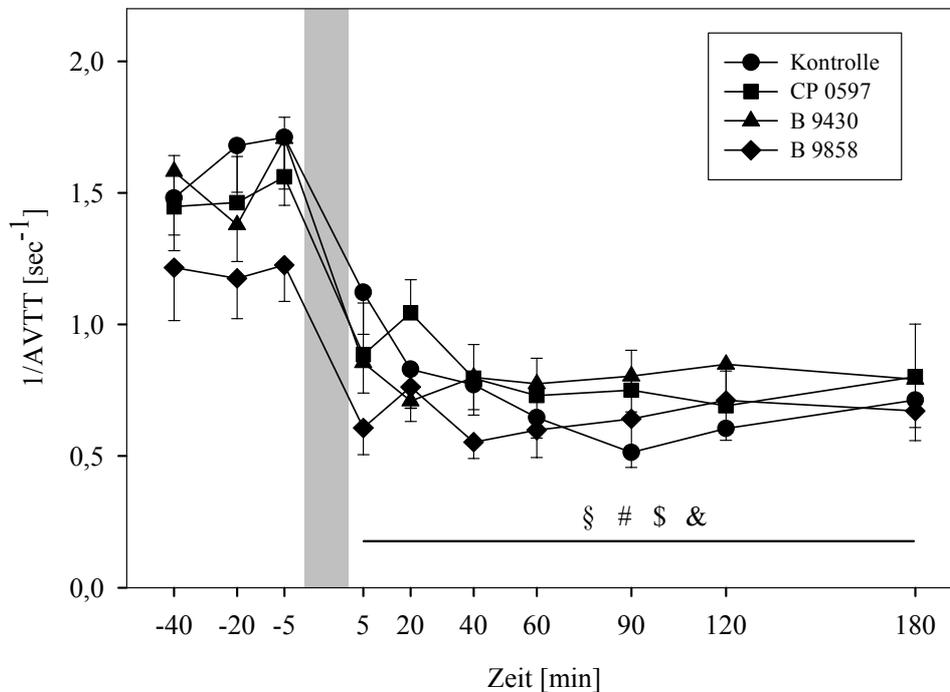


Abbildung 32: Mikrovaskuläre Perfusion vor und nach der Ischämie, $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B2-Antagonistengruppe (CP 0597), \$ $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1/B2-Antagonistengruppe (B 9430), & $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1-Antagonistengruppe (B 9858), der graue Balken zeigt die Dauer der Ischämie an.

3.2.6 Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht

Nach der Akutphase des Versuchs sowie der Ausleitung der Narkose erwachten alle 40 Versuchstiere. In der Kontrollgruppe überlebten sieben Wüstenrennmäuse die Beobachtungsphase von vier Tagen, in der B2-Antagonistengruppe neun, in der B1-Antagonistengruppe vier und in der B1/B2-Antagonistengruppe drei. Die statistische Analyse der Überlebenszeiten ergab, dass der Vergleich aller Gruppen miteinander unter Verwendung des Mehrstichprobentests nach Mantel einen Signifikanzwert von $p=0,02$ hatte, d.h. es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Der Vergleich jeweils zweier Gruppen miteinander zeigte, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die

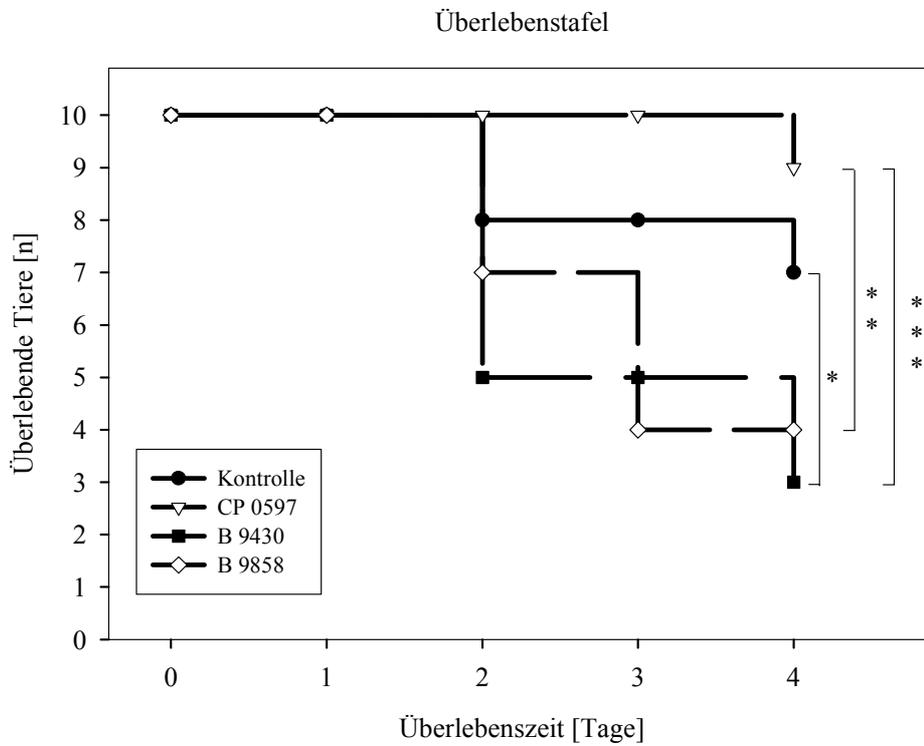


Abbildung 33: Kaplan-Meier Überlebenskurve für die Versuchsgruppen mit Bradykinin-Antagonisten, * $p=0,03$, ** $p=0,001$, *** $p=0,004$

Gruppe mit B1/B2-Antagonisten eine verminderte Überlebenszeit aufwies. Die Überlebensdauer war in der Gruppe mit B1/B2-Antagonisten im Vergleich zur Gruppe mit B2-Antagonisten signifikant verringert ($p=0,001$). Auch bei der Gruppe mit dem B1-Antagonisten erwies sich die Überlebensdauer im Vergleich zur B2-Antagonisten-Gruppe als signifikant vermindert ($p=0,004$).

Der Neuroscore fiel in allen Gruppen im Beobachtungszeitraum von vier Tagen ab. Allerdings war der Neuroscore in der B2-Antagonistengruppe erst am Tag vier signifikant vermindert, wohingegen in der Kontroll-, der B1/B2-Antagonisten- und der B1-Antagonistengruppe dieser bereits am ersten Tag nach der Ischämie signifikant gegenüber dem Ausgangswert vermindert war. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen lag nicht vor.

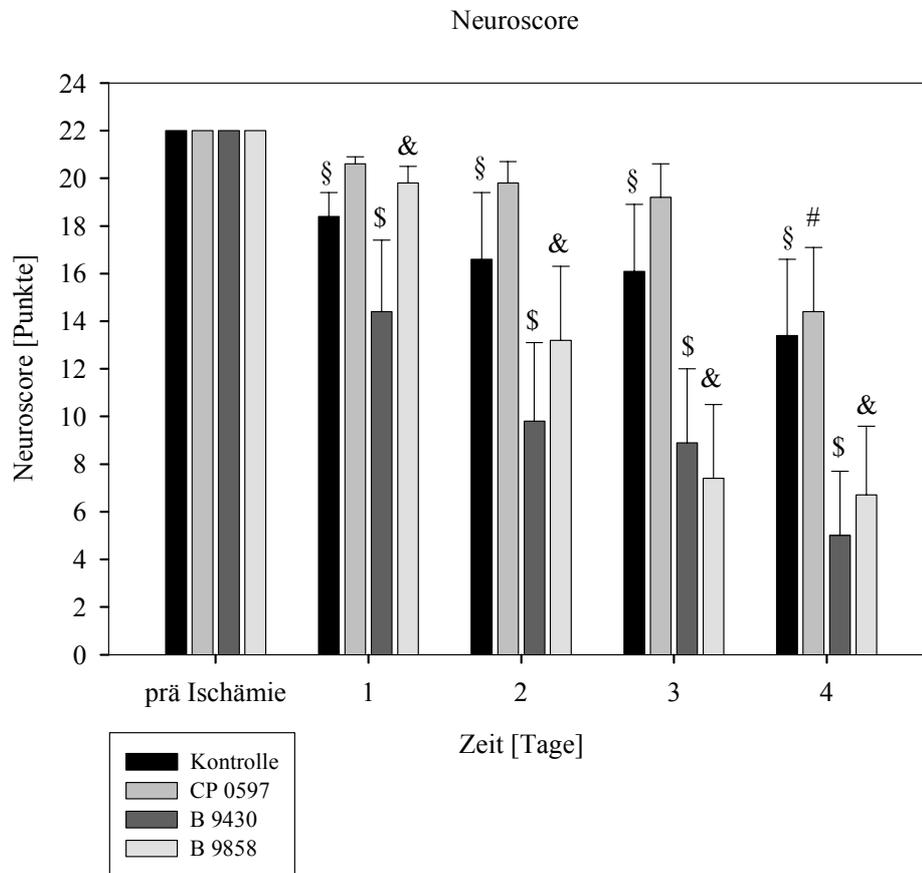


Abbildung 34: Neuroscore vor Beginn des Versuchs und im Beobachtungszeitraum von vier Tagen nach der Ischämie, $MW \pm SEM$, § $p < 0,05$ vs. Ausgangswert Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B2-Antagonistengruppe (CP 0597), \$ $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1/B2-Antagonistengruppe (B 9430), & $p < 0,05$ vs. Ausgangswert B1-Antagonistengruppe (B 9858).

Die Analyse des Körpergewichts der Wüstenrennmäuse in den verschiedenen Versuchsgruppen ergab, dass die postischämische Gewichtsreduzierung in allen Gruppen gleich war. Es ist zu beachten, dass im Beobachtungszeitraum in den Gruppen unterschiedlich viele Tiere verstorben sind und zum jeweiligen Tag nur das Gewicht der noch lebenden Tiere bestimmt wurde. Der Parameter ist also mit einem bestimmten Ausfall verbunden und damit ist die Aussagekraft eingeschränkt.

	<i>Gewicht [g] Kontrolle</i>	<i>Gewicht [g] CP 0597</i>	<i>Gewicht [g] B 9430</i>	<i>Gewicht [g] B 9858</i>
<i>Vor Ischämie</i>	65,5 ± 1,4	68,8 ± 1,0	66,1 ± 1,1	68,2 ± 1,1
<i>1. Tag</i>	59,9 ± 1,1	61,0 ± 1,5	60,1 ± 1,3	61,7 ± 1,2
<i>2. Tag</i>	56,9 ± 1,1	57,9 ± 1,1	55,1 ± 1,1	57,1 ± 1,3
<i>3. Tag</i>	54,6 ± 1,3	56,0 ± 1,4	52,0 ± 0,5	54,4 ± 2,8
<i>4. Tag</i>	55,6 ± 1,2	53,1 ± 2,1	49,3 ± 0,7	52,4 ± 3,4

Tabelle 11: *Körpergewicht vor Beginn des Versuchs und im Beobachtungszeitraum von vier Tagen, MW ± SEM.*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem neurologischen Defizit oder der Überlebensdauer der Gerbils und dem Ausmaß der Leukozyten-Endothelinteraktion zu prüfen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die vier Größen sind völlig unabhängig voneinander, ein statistisch signifikanter Zusammenhang lag nicht vor.

	Korrelationskoeffizient			
	Kontrolle	CP 0597	B 9430	B 9858
Überlebensdauer vs. rollende Leukozyten	0,210	0,291	-0,299	-0,642
Überlebensdauer vs. adhärenente Leukozyten	-0,086	0,467	0,146	-0,408
Neuroscore vs. rollende Leukozyten	0,245	0,348	-0,323	-0,459
Neuroscore vs. adhärenente Leukozyten	0,120	0,705	0,332	-0,176

Tabelle 12: *Korrelation zwischen Leukozyten-Endothelinteraktionen und Überlebensdauer oder Neuroscore.*

3.2.7 Histomorphometrie

Wie schon im Teil Methodik beschrieben, wurden vitale Nervenzellen anhand histologischer Schnitte in verschiedenen anatomischen Regionen beurteilt. Es konnten in der Kontrollgruppe sechs Gehirne in die Analyse eingehen, in der Gruppe mit B2-Antagonisten acht, in der Gruppe mit B1/B2-Antagonisten drei und in der Gruppe mit B1-Antagonisten vier Gehirne. Die Beurteilung umfasste nur Gehirne, die nach einer Perfusionsfixation entnommen werden konnten, um eine fehlerhafte Aussage wegen postmortalen Autolyse ausschließen zu können. Die Gehirne der Tiere, die frühzeitig an den Folgen der zerebralen Ischämie verstarben, konnten daher nicht in die Auswertung einbezogen werden.

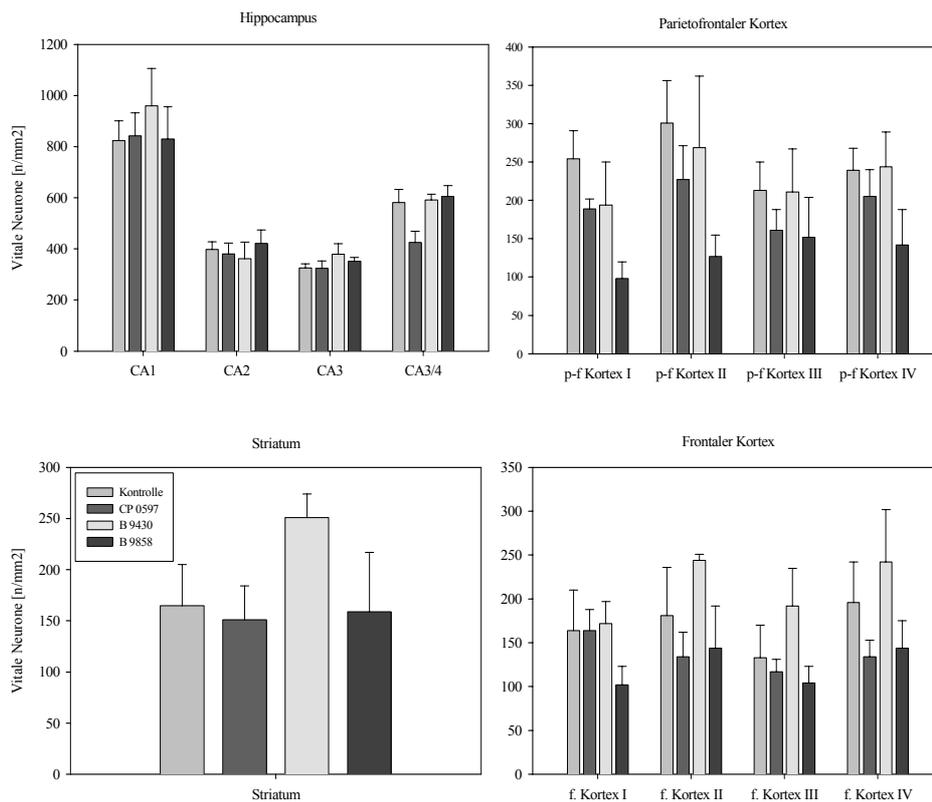


Abbildung 35: Dichte vitaler Neurone in verschiedenen Hirnarealen vier Tage nach der Ischämie. Hippocampus: Cornu ammonis 1-3/4, Parietofrontaler Kortex: Schicht I-IV, Striatum und Parietaler Kortex: Schicht I-IV, MW ± SEM.

Die Gehirne der Tiere, die den B2-Antagonisten erhielten, wiesen in allen Arealen eine leicht niedrigere Dichte vitaler Nervenzellen auf als die Gehirne aus der Kontrollgruppe. Die Gehirne aus der B1/B2-Antagonistengruppe zeigten im Hippokampus und frontoparietalen Kortex ein variables Bild mit abwechselnd höherer und niedrigerer Zelldichte und im Striatum und frontalen Kortex mit eher höheren Werten. Die Tiere, die mit dem B1-Antagonisten behandelt wurden, wiesen größtenteils gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe eine in allen Hirnarealen reduzierte Nervenzelldichte auf. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3 Intravitalmikroskopische Aufnahmen

Beispielhaft werden zwei Bilder eines Kapillargebietes abgebildet. Diese Aufnahmen sollen das Prinzip des “no-reflow” Phänomens, den Verschluss von Kapillaren nach einer Ischämie, verdeutlichen. Es ist ein Kapillargebiet fünf Minuten vor und 60 Minuten nach der Ischämie zu erkennen, das jeweils während einer Bolusinjektion von Rhodamin 6G aufgenommen wurde. Der Fokus wurde bei beiden Aufnahmen auf dieselbe Ebene eingestellt. In der oberen rechten Ecke ist eine Kapillare gelegen, in der zum späteren Zeitpunkt ein Leukozyt festsetzt und die Kapillare verschließt, weshalb das distale Kapillarlumen nicht angefärbt ist, also auch nicht perfundiert wird. Vor der Ischämie war diese Kapillare regelrecht perfundiert, zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Beginn der Reperfusion und später konnte an dieser Stelle ebenfalls kein Perfusionsdefizit beobachtet werden.

Zwei Aufnahmen einer Venole sind fünf Minuten vor Beginn der Ischämie und drei Stunden nach Reperfusionbeginn dargestellt. Frei fließende Leukozyten sind wegen ihrer hohen Geschwindigkeit nicht zu erkennen. Schnell rollende Leukozyten ziehen einem Kometen gleich einen hellen Streifen hinter sich her, was durch die langsame Bildwiederholungsrate der Restlichtkamera bedingt ist. Langsam rollende und fest adhärenente Leukozyten sind als helle Punkte zu erkennen. Vor Beginn der Ischämie konnten keine Leukozyten-Endothelinteraktionen beobachtet werden, dagegen haften am Ende der Beobachtungsphase zahlreiche rollende und fest adhärenente Leukozyten am Gefäßendothel an.

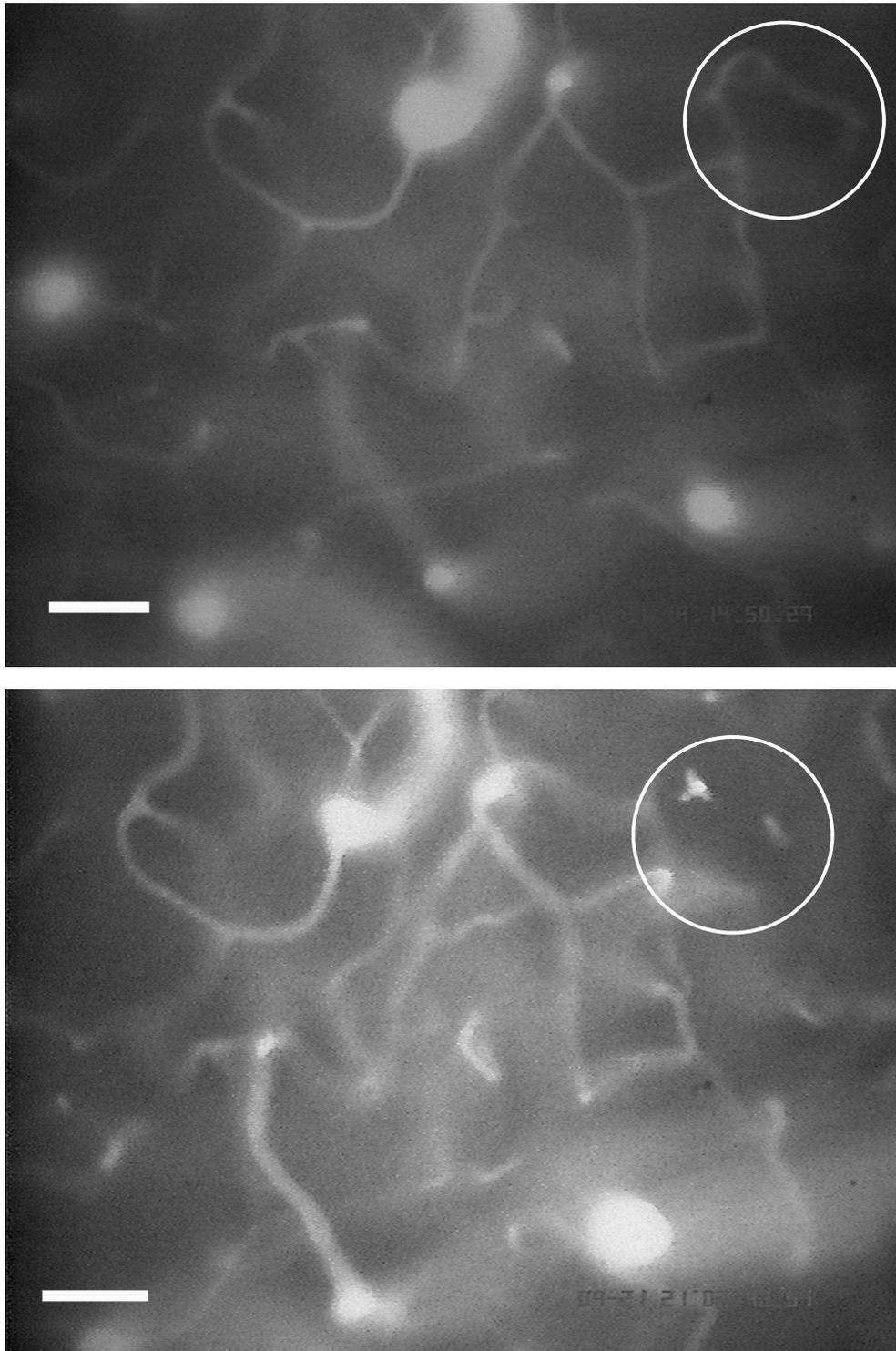


Abbildung 35: Kortikale Kapillaren fünf Minuten vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) Ischämie. Lediglich eine Kapillarschleife ist kurzzeitig 60 Minuten nach Ischämie, und auch nur zu diesem Messzeitpunkt, durch einen Leukozyten verlegt, die Kapillarperfusion im Beobachtungsareal ist weitestgehend erhalten. Maßstab = 50 μm

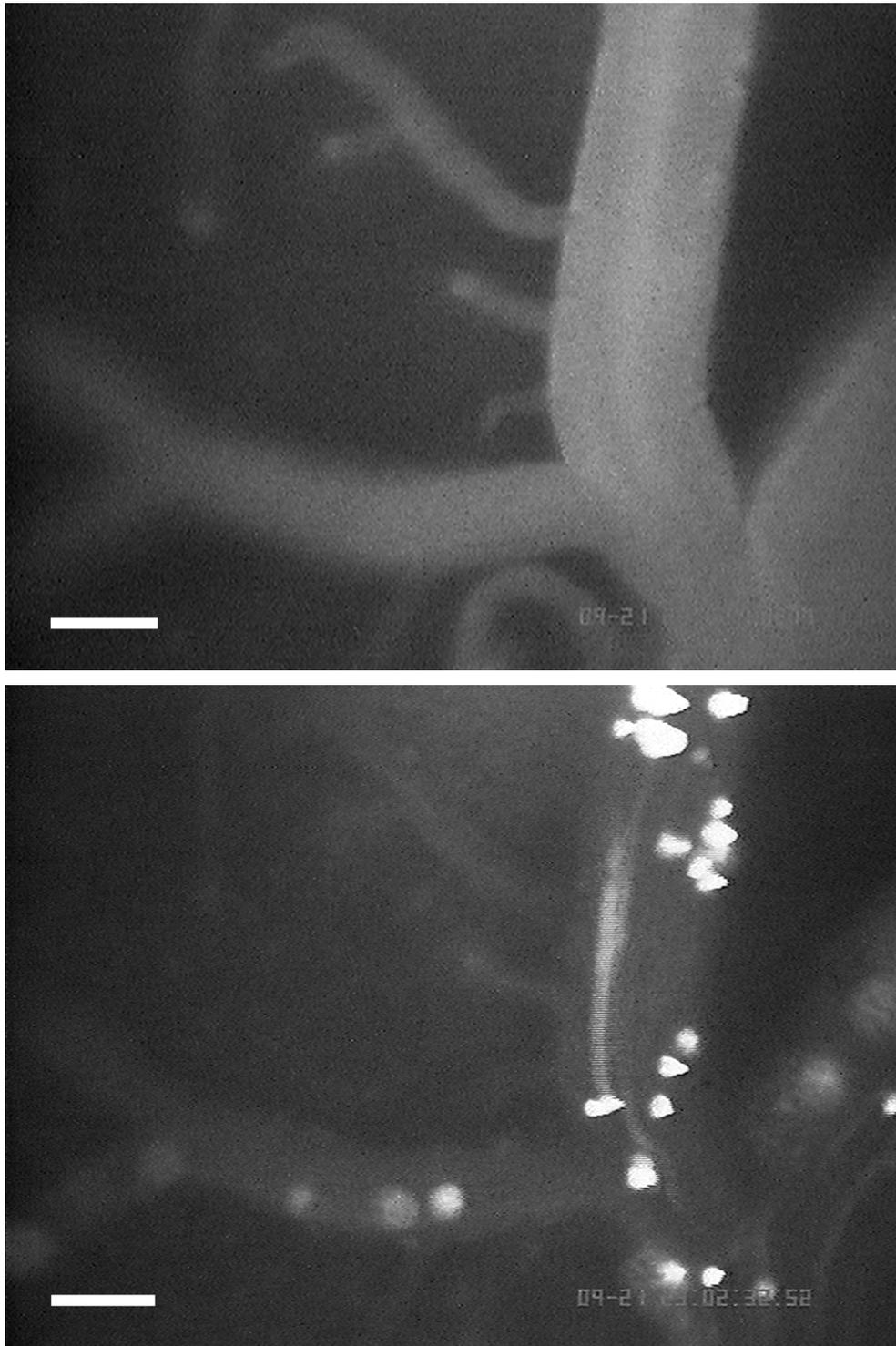


Abbildung 36: Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer pialen Venole fünf Minuten vor und 180 Minuten nach Ischämie. Nach Ischämie sind zahlreiche Leukozyten (helle Punkte) zu erkennen, die am Endothel entlang rollen oder fest adhäreren. Maßstab = 50 μm .

3.4 Elektronenmikroskopie

Von Gehirnen der Tiere der Bradykininserie wurden beispielhaft elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blutgefäßen und Hirngewebe angefertigt. Die Tiere wurden dazu am vierten postischämischen Tag kardial mit Karnovski-Lösung perfundiert, das Gehirn entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in derselben Lösung aufbewahrt. Da nur von je einem Gehirn pro Gruppe elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt wurden, können keine quantitativen Aussagen über das Ausmaß von Leukozyten-Endothelinteraktionen, Emigration von Leukozyten in das Parenchym, die Verlegung von Kapillaren mit Leukozyten, perivaskuläres Ödem oder Gewebeschaden getroffen werden. Die Bilder sind vielmehr anschauliche Beispiele der oben genannten Vorgänge im Gehirn nach einer globalen zerebralen Ischämie. Die ersten drei Bilder stellen schrittweise die Emigration von Leukozyten in das Parenchym dar. In der Abbildung 37 sind zwei adhärente Leukozyten zu erkennen, wobei einer der Leukozyten bereits das Endothel durchbrochen hat, in Abbildung 38 liegt ein Leukozyt einer Kapillare von extraluminal an. Ein weiterer Leukozyt ist weiter von der Kapillare entfernt in das Parenchym emigriert. In Abbildung 40 ist ein Leukozyt zu sehen, der das Lumen einer Kapillare verlegt. Das “no-reflow” Phänomen soll durch diese Art von mikrovaskulärem Verschluss verursacht werden.

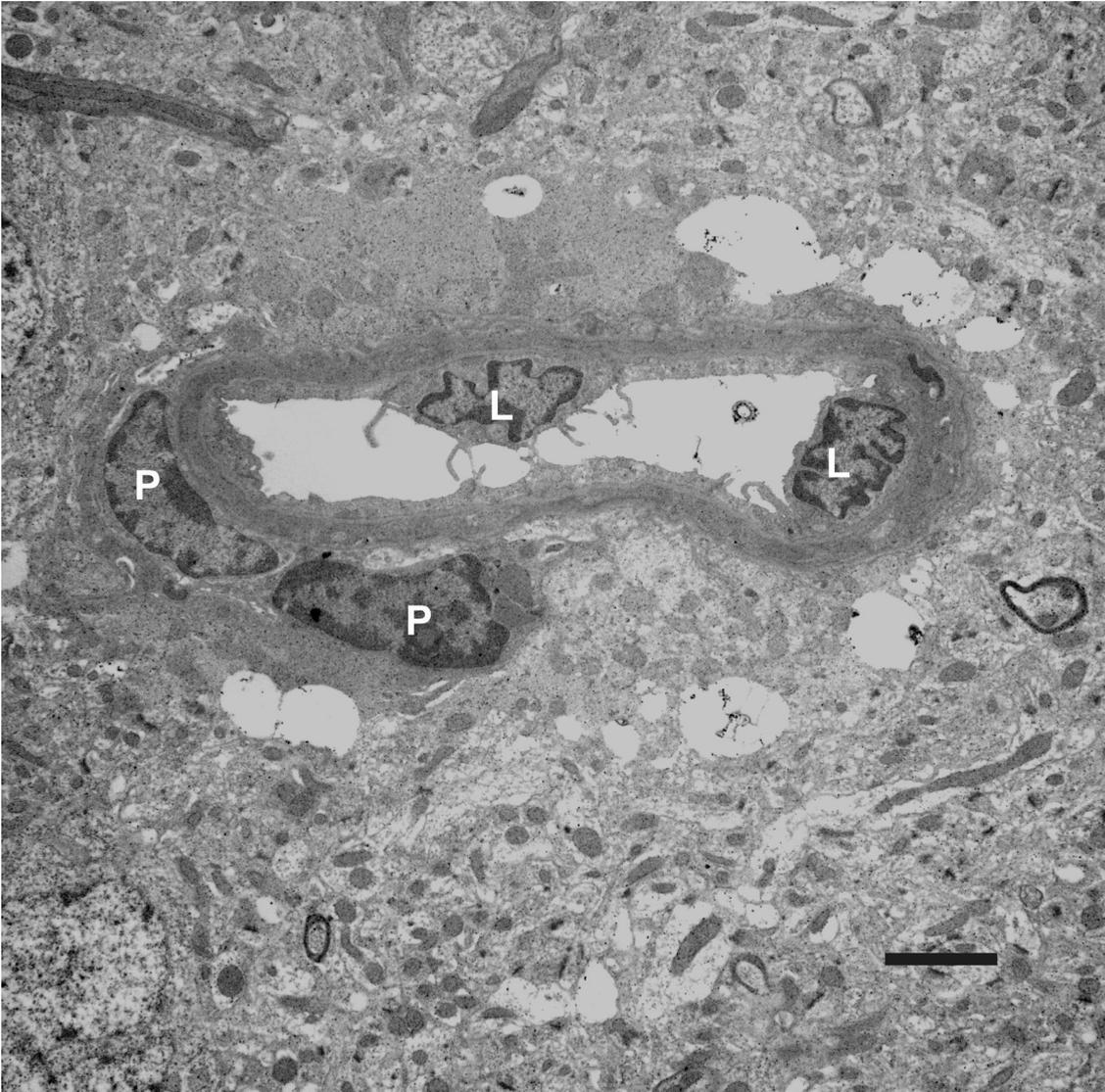


Abbildung 37: Die Elektronenmikroskopie zeigt eine postkapilläre Venole an deren Endothel zwei polymorphkernige Leukozyten (mit "L" markiert) anliegen, wobei der obere Leukozyt das Endothel schon durchbrochen hat und der Basalmembran direkt aufliegt. Er streckt einem Octopus gleich Protrusionen aus, die an einigen Stellen sogar das gegenüberliegende Endothel berühren. Von außen liegen dem Gefäß zwei Perizyten (mit "P" markiert) an. Ein perivaskuläres Ödem ist nur gering ausgebildet. Maßstab = 2,5 μm .

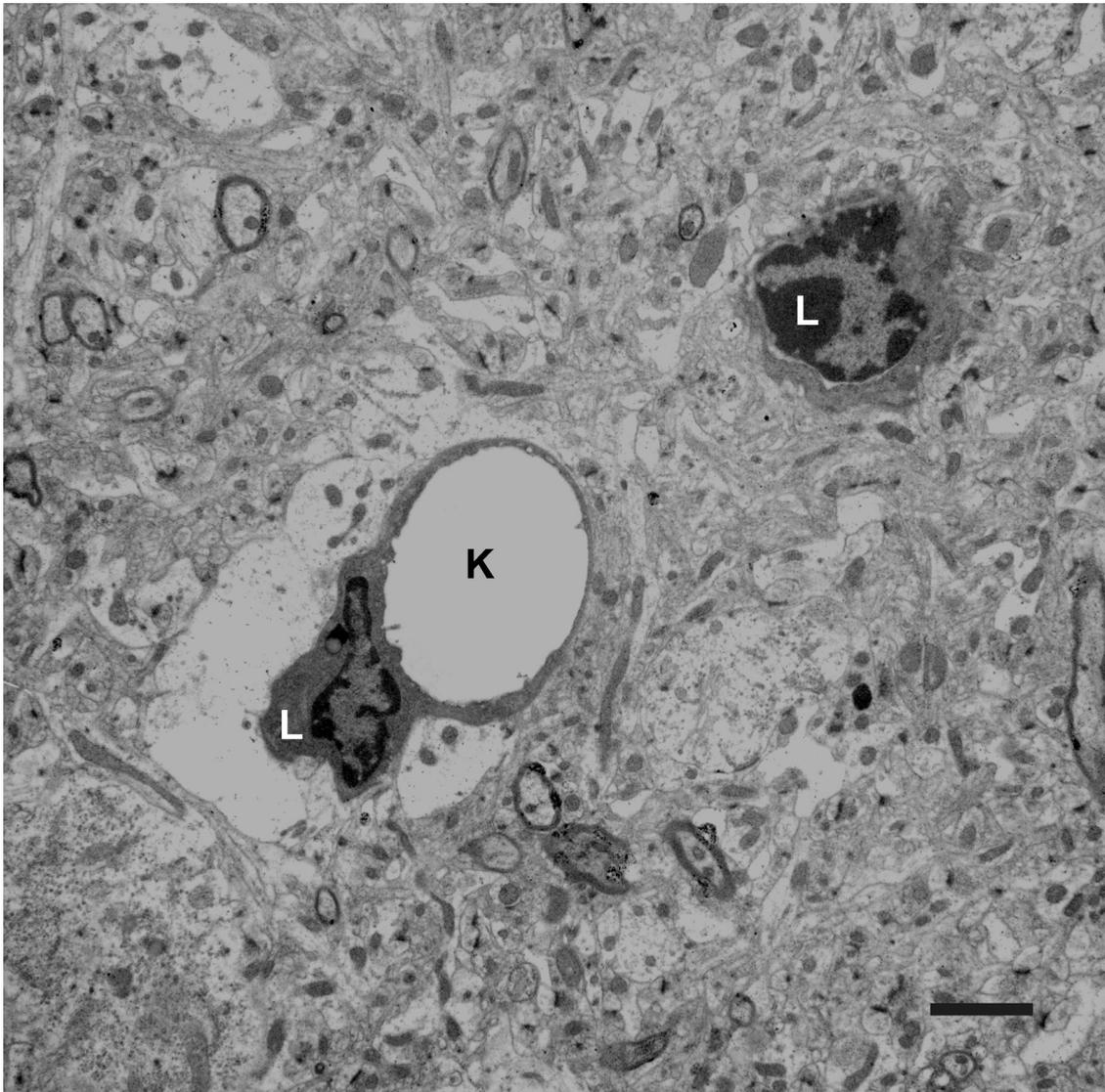


Abbildung 38: Die Aufnahme aus dem Hippocampus zeigt eine Kapillare (mit "K" markiert) an der von extraluminal her ein polymorphkerniger Leukozyt (mit "L" markiert) anliegt. Ein weiterer Leukozyt liegt weit von der Kapillare entfernt im Hirnparenchym. Maßstab = 2,5 μm .

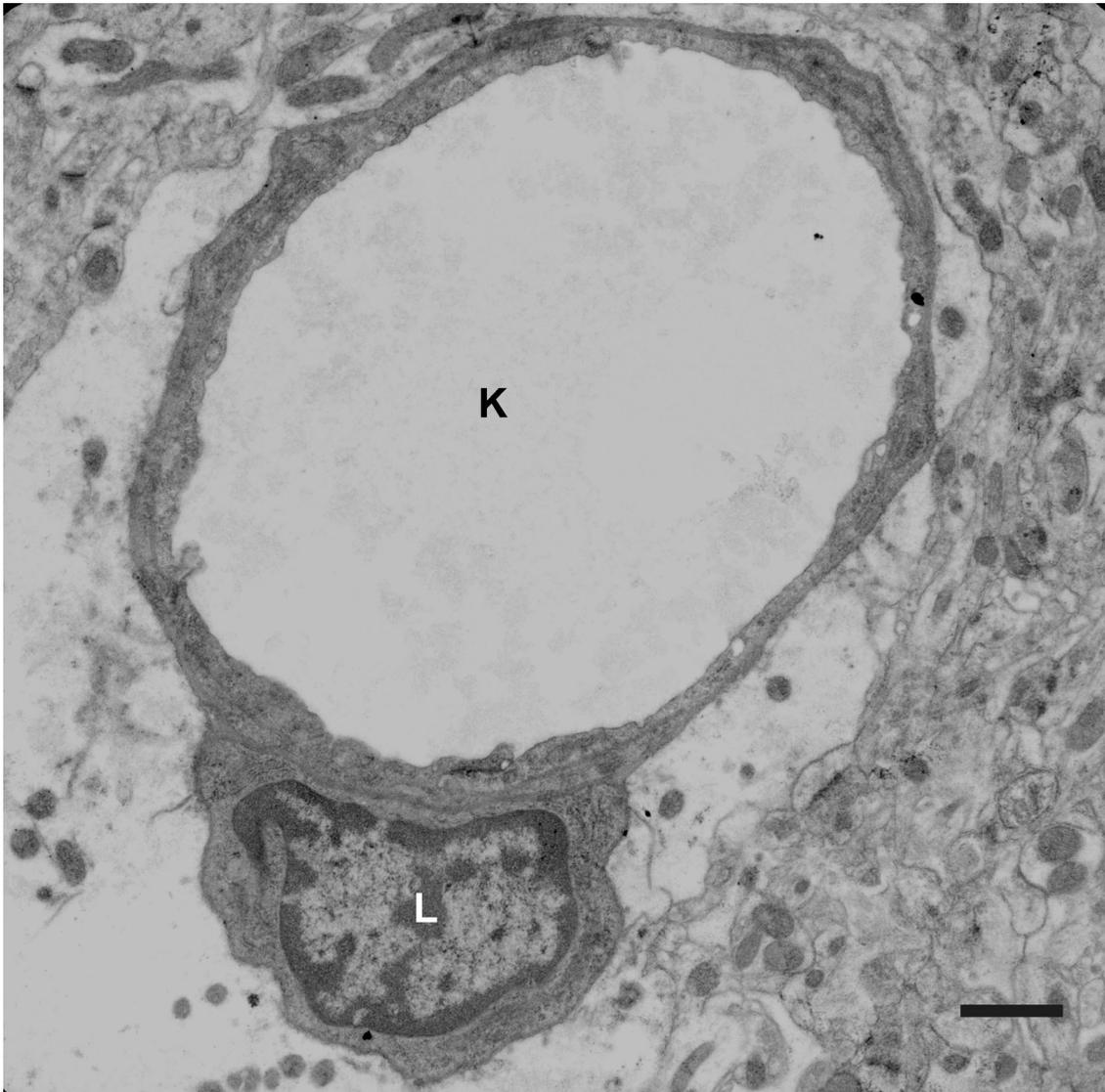


Abbildung 39: Die gleiche Kapillare (mit "K" markiert) wie bereits in Abbildung 38 ist hier nochmals in einer anderen Schnittebene und einer höheren Vergrößerung aufgenommen. Es ist zu erkennen, dass der Leukozyt (mit "L" markiert) der Basalmembran außen anliegt und dass es sich nicht um einen Zellkern einer Endothelzelle handelt. Maßstab = 1,1 μm .

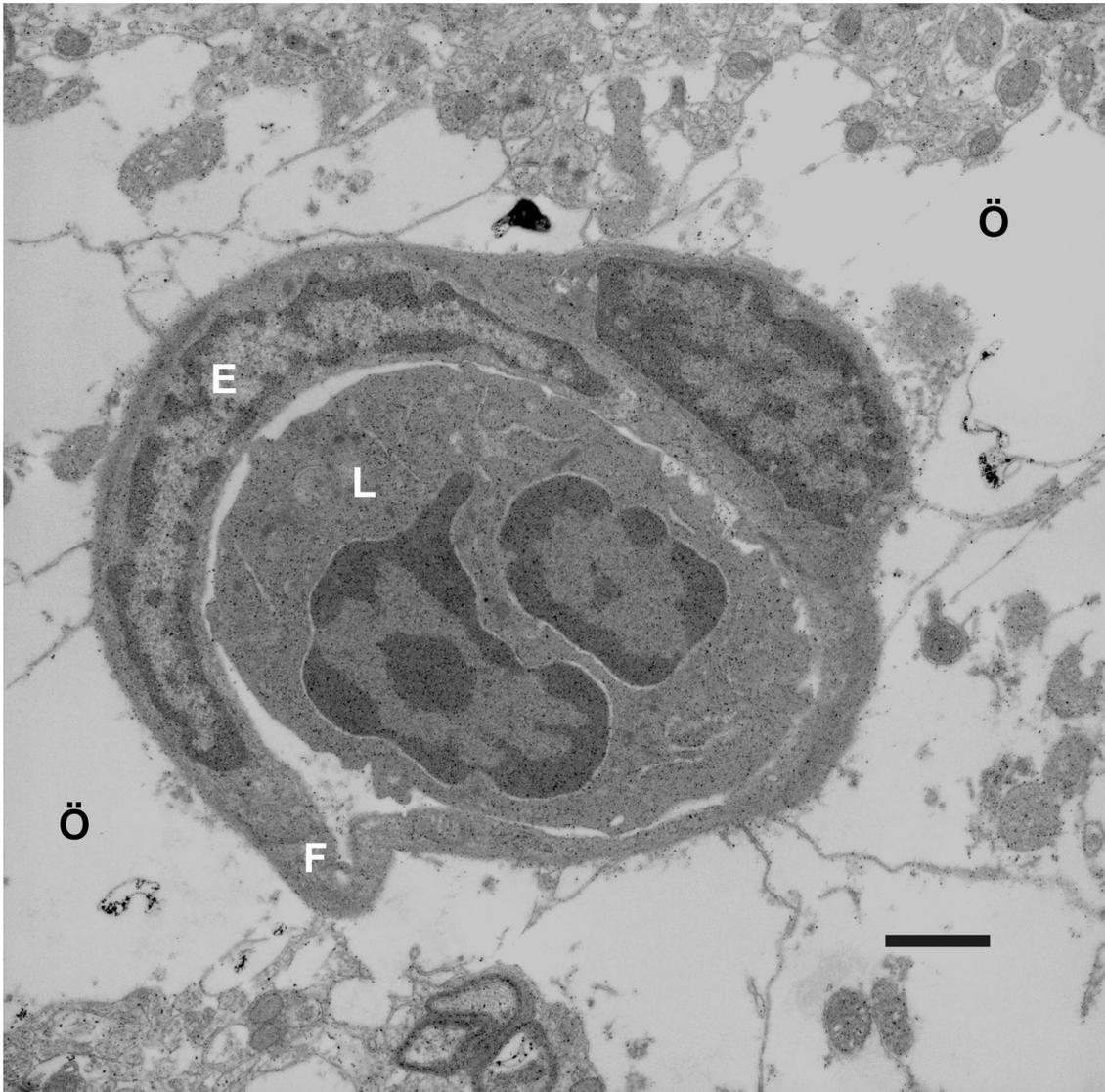


Abbildung 40: Das EM-Bild zeigt einen polymorphkernigen Leukozyten (mit "L" markiert), der das Lumen einer Kapillare beinahe vollständig verschließt. Die Leukozytenmembran hat an mehreren Stellen, teils auch über Protrusionen der Zellmembran, Kontakt mit der Endothelzellmembran. Um die gesamte Kapillare herum ist ein perivaskuläres Ödem (mit "Ö" markiert) zu erkennen, das für die Faltung (mit "F" markiert) der Endothelzelle (mit "E" markiert) ursächlich sein könnte. Die Gewebeprobe stammt aus dem Striatum eines Gerbils. Maßstab = 2,5 μm .

4 Diskussion

4.1 Experimentelles Modell

4.1.1 Verwendung eines Tiermodells

Zur systematischen Erforschung der Pathophysiologie sowie der Behandlung der zerebralen Ischämie sind nicht nur Untersuchungen am Menschen, sondern auch Experimente *in vivo* und *in vitro* erforderlich. Untersuchungen am Menschen allein sind nicht ausreichend, da die zerebrale Ischämie des Menschen in ihrer Manifestation enorm variabel ist; auch die auslösenden Faktoren und die anatomische Zuordnung sind vielfältig. Ereignisse in den ersten Minuten und Stunden nach einer zerebralen Ischämie können nur selten erfasst werden, da die Patienten oft erst spät das Krankenhaus zur Behandlung erreichen. Für zahlreiche pathophysiologische, pathobiochemische und histopathologische Analysen sind invasive chirurgische Eingriffe mit direktem Zugang zum Hirngewebe erforderlich, die mit Risiken für den Patienten verbunden sind. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in vitro* Untersuchungen, wie z.B. Experimenten an Gewebeschnitten oder Zellkulturen, auf den Menschen ist oft nur bedingt möglich. Ergebnisse aus Experimenten an Tieren sind hingegen gut auf den Menschen übertragbar, und gerade Durchblutungsstörungen lassen sich einfach und standardisiert erzeugen. Ein zunehmend wichtiger Aspekt ist, dass Untersuchungen an Tieren sehr viel kostengünstiger sind als Untersuchungen am Menschen und so mit geringerem finanziellem Aufwand mehr Information gesammelt werden kann.

4.1.2 Auswahl des Versuchstieres

Obwohl auch größere Tierspezies vielseitige Verwendung hatten, sind Nagetiere, insbesondere Mäuse, Gerbils und Ratten, derzeit die am häufigsten verwendete Spezies in der Ischämieforschung. Dies hat mehrere Gründe. Die Aufzucht und die Haltung sind

kostengünstig. Die benötigten Mengen an Chemikalien und Medikamenten und damit die Kosten sind bei Nagern wegen ihres niedrigen Gewichtes gering. Antikörper gegen bestimmte Moleküle sind teilweise nur für Nager erhältlich. Auch ist die Aufbereitung des gesamten Gehirns für die Histologie wegen der relativ kleinen Gewebeproben mit geringem Zeitaufwand zu bewältigen. Die Tiere besitzen durch Inzucht eine große Homogenität innerhalb der Abstammungslinien und einen hohen Grad genetischer Homologie zu größeren Säugern. Die Nutzung von Kleintieren ist verglichen mit der Nutzung von Haustieren wie Katzen und Hunden oder subhumanen Primaten von größerer ökologischer und ethischer Akzeptanz. Verfeinerte mikrochirurgische Techniken unter Anwendung eines Operationsmikroskops erlauben die Präparationen bei Nagern trotz der geringen Körpergröße.

Die Experimente wurden an Mongolischen Wüstenrennmäusen - Gerbils - durchgeführt, wobei die nachfolgend genannten Eigenheiten dieser Spezies genutzt werden konnten:

Gerbils besitzen keine Aa. communicantes posteriores, d.h. es liegt eine Unvollständigkeit des Circulus arteriosus Willisii vor (Kahn 1972, Levine et al. 1969, Levy et al. 1974). Lediglich kleine Arteriolen mit einem Durchmesser von maximal 30-60 μm stellen insuffiziente Verbindungen zwischen dem hinteren vertebrobasilären und dem vorderen, durch die Aa. carotides internae versorgten Hirnkreislauf dar (Levy et al. 1974). Diese anatomische Besonderheit ermöglicht die Erzeugung einer nahezu vollständigen Ischämie des Großhirns durch Okklusion beider Halsschlagadern bei erhaltener Versorgung des Hirnstamms mit den wichtigen Regulationszentren für Kreislauf und Atmung. Aufgrund dieser technischen Einfachheit wurden Gerbils vielfach in Untersuchungen zur globalen zerebralen Ischämie eingesetzt und als valides Modell etabliert (Bubis et al. 1976, Hanyu et al. 1997, Ito et al. 1976, Ito et al. 1977, Ito et al. 1975, Mrsulja et al. 1975, Mrsulja et al. 1976, Stummer et al. 1994).

Ein weiterer wichtiger Vorteil des Gerbils bei der Intravitalmikroskopie ist die Feinheit der Strukturen. Die Dura mater ist dünn, der Subarachnoidalraum schmal. Dies macht die Epifluoreszenzmikroskopie der Gefäße der Hirnoberfläche nach Entfernung der

Schädelkalotte mit intakter harter Hirnhaut möglich. Schon bei der Ratte ist die Mikroskopie durch die Dura mater unmöglich, so dass ein offenes oder sekundär geschlossenes Schädelfenster präpariert werden muss (Ellis et al. 1983). Verschiedene Autoren berichteten allerdings von Herniationen des Gehirns von Ratten schon bei Eröffnung der Kalotte (Schürer et al. 1989, Schürer et al. 1988). Die Anwendung eines sekundär geschlossenen Schädelfensters bei der Ratte stellt allerdings immer noch ein Trauma der Oberfläche des Gehirnes dar. Hierfür spricht eine Arbeit von Dirnagl et al., die das Adhäsionsverhalten von Leukozyten mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht haben. Sie beobachteten bereits in der Kontrollphase kurz nach Beendigung der Präparation rollende und fest adhärente Leukozyten in postkapillären Venolen (Dirnagl et al. 1994). Bei unserem Modell des geschlossenen Schädelfensters mit intakter Dura mater beim Gerbil lag hingegen keine Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen während der Kontrollphase vor. Lagen allerdings kleine Blutungen aus den Duragefäßen auf die Dura mater vor oder wurde die Dura mater mit den Instrumenten oder Tupfern berührt, so konnte eine Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen beobachtet werden. Eine Aktivierung der Leukozyten in der präischämischen Kontrollphase wurde deshalb als Ausschlusskriterium festgelegt und diese Tiere von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Das Schädelfenster mit intakter Dura mater ist damit nicht nur relativ einfach zu präparieren, sondern stellt auch ein Modell dar, mit dem Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen möglich sind.

Das Protokoll sah ein postischämisches Überleben von vier Tagen vor. Auch für diesen Zeitraum kann das Schädelfenster beim Gerbil als optimal bezeichnet werden. Nur ein Teil der Kalotte wurde entfernt und die Dura mater nicht verletzt. Hinweise auf eine bakterielle Meningitis oder Enzephalitis ergaben sich nicht, größere Ansammlungen von Leukozyten im Subarachnoidalraum oder Hirnparenchym wurden nicht beobachtet. Das Überleben blieb von der Anlage des Fensters unbeeinflusst.

4.1.3 Modell der globalen zerebralen Ischämie

Grundsätzlich kann die experimentelle zerebrale Ischämie global oder fokal sein, wobei nicht nur der Anteil des ischämischen Gebietes am gesamten Gehirn Wichtigkeit erlangt (Siesjö et al. 1995). Auch die Lokalisation und besonders die Dauer der Ischämie gehen in die Bezeichnung als global oder fokal mit ein. Bei der Wahl des Ischämie Modells müssen die Unterschiede hinsichtlich Größe, Lokalisation und Dauer sowie Art der Induktion der Ischämie bei der zu bearbeitenden Fragestellung berücksichtigt werden.

Tiermodelle der globalen zerebralen Ischämie simulieren z.B. den Kreislaufstillstand mit kardiopulmonaler Reanimation. Ischämie bezeichnet wörtlich die komplette Stase des Blutes. Mit experimentellen Methoden der zerebralen Ischämie wird allerdings selten eine komplette Stase der zerebralen Durchblutung erreicht, vielmehr ist oft noch eine Restdurchblutung vorhanden. In experimentellen Studien ist die globale zerebrale Ischämie gekennzeichnet durch ihre kurze Dauer von wenigen Minuten bis maximal einer Stunde (Hossmann et al. 1987), wobei die Durchblutung um 90% oder mehr vermindert sein muss, damit sich ein ischämischer Hirnschaden entwickelt. Bestimmend für die Durchblutungsminderung ist die Spezies und die Art der Induktion der Ischämie. Die experimentellen Techniken zur Erzeugung einer globalen zerebralen Ischämie umfassen die Okklusion großer hirnversorgender Arterien (Aa. carotides communes, Aa. vertebrales, Aorta, Truncus brachiocephalicus), die Induktion eines Herzstillstandes, die Unterbindung der Blutzufuhr durch pneumatische Halskrawatten, die Erhöhung des intrakraniellen Drucks durch die intraventrikuläre Infusion künstlichen Liquors, das Aufblasen eines intrakraniellen Ballons oder die Dekapitation (Abe et al. 1983, Pulsinelli et al. 1979, Siemkowicz et al. 1978). Unterschieden werden müssen hiervon Ansätze, die im eigentlichen Sinn zu keiner Ischämie sondern zu einer Hypoxämie führen, wie die Reduktion des Sauerstoffanteils oder der Ersatz von Sauerstoff durch Stickstoff bei der kontrollierten Beatmung (Levine 1960). Beim experimentellen Herzstillstand, meist durchgeführt bei größeren Vertebraten wie dem Hund oder der Katze, kann von einer beinahe vollständigen Stase ausgegangen werden. Bei Nagern wird die globale Ischämie meist durch den temporären Verschluss großer hirnversorgender Arterien induziert. Als

besonders wichtig sind dabei die Kollateralversorgung des Gehirns und der zerebrale Perfusionsdruck anzusehen. So führt der transitorische bilaterale Verschluss der Aa. carotides communes bei der Ratte nicht zu einer Infarzierung des Gehirns, sogar der permanente Verschluss beider Halsschlagadern wird überlebt. Bei der Ratte muss die Durchblutung durch den zusätzlichen Verschluss der Aa. vertebrales oder durch Blutdrucksenkung auf Werte um 50 mmHg weiter reduziert werden (Ginsberg et al. 1989, Pulsinelli und Brierley 1979). Es wurde bereits weiter oben darauf hingewiesen, dass Gerbils über einen inkompletten Circulus arteriosus willisii verfügen. Durch den Verschluss der beiden Aa. carotides communes wird eine beinahe komplette Stase des Blutes im Großhirn induziert. Die Reperfusion ist bei der globalen zerebralen Ischämie für das Überleben der Versuchstiere unverzichtbar. Der ischämische Hirnschaden tritt in selektiv-vulnerablen Hirnarealen, i.e. den Neuronen der CA1-Region des Hippocampus, den Betz'schen Riesenzellen der Schicht 5 des Kortex sowie den kleinen und mittleren Neuronen des Striatums, verzögert auf, wobei der Erstbeschreiber (Ito) dieses Phänomen als "maturation" bezeichnet hat (Ito et al. 1975, Pulsinelli et al. 1982).

Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie simulieren den akuten thromboembolischen Hirninfarkt beim Menschen (Molinari 1988). Grundsätzlich ist die Reperfusion bei der fokalen Ischämie nicht obligat, und es werden die temporäre, von Minuten bis zu drei Stunden Dauer, und die permanente fokale Ischämie unterschieden. Die größte Verbreitung fanden Modelle der Okklusion der A. cerebri media bei Ratten, bei denen die fokale Läsion auf vielfältige Weise induziert werden kann. Beispiele sind die Okklusionen des Gefäßes durch Elektrokoagulation, Klippung, einen intraluminalen Faden oder durch Photothrombose (Ginsberg et al. 1989, Papadopoulos et al. 1987, Tamura et al. 1981, Watson et al. 1985). Hauptunterschiede zur globalen zerebralen Ischämie sind die Ausbildung einer Nekrose im Kerngebiet der Herdes sowie die Existenz einer perifokalen Randzone, der Penumbra (Astrup et al. 1981, Nilsson et al. 1977). Die Durchblutung ist im ischämischen Kerngebiet auf unter 20 % des Ausgangswertes reduziert. In der Penumbra ist die Durchblutung auf etwa 20-40% des Ausgangswertes vermindert. Im ischämischen Kerngebiet reicht die Durchblutung nicht aus, um den Strukturstoffwechsel aufrecht zu

erhalten. In der Penumbra hingegen bleibt die Struktur für einen bestimmten Zeitraum noch erhalten, aber der Funktionsstoffwechsel kommt zum Erliegen. Weitere Charakteristika dieser Zone sind erhöhte Sauerstoffextraktion, Azidose und Periinfarktdepolarisationen, wobei diese Vorgänge das Gewebe zusätzlich schädigen können (Astrup et al. 1977, Branston et al. 1977). Nicht nur der Grad, sondern auch die Dauer der Durchblutungsstörung spielt für das Überleben von Neuronen eine wichtige Rolle. Dies belegen Untersuchungen, die zeigten, dass das Areal der Penumbra innerhalb von sechs Stunden nach Induktion der Ischämie in nekrotisches Gebiet umgewandelt wurde (Back et al. 1994, Heiss et al. 1983, Hossmann 1994, Kohno et al. 1995).

Die oben wiedergegebenen Ausführungen zeigen die grundsätzlichen Unterschiede und Ähnlichkeiten zwischen der globalen und der fokalen zerebralen Ischämie auf. Es wurde dargestellt, dass Untersuchungen sowohl der globalen als auch der fokalen zerebralen Ischämie für die Aufklärung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge der zerebralen Ischämie des Menschen Bedeutung haben, wobei der Herzstillstand und der Schlaganfall die häufigsten Formen darstellen. Insbesondere gewinnen Untersuchungen, bei denen die Ischämie nur von kurzer Dauer ist, immer mehr an Bedeutung, da es in der klinischen Praxis immer häufiger gelingt, die Zeitspanne bis zur Reperfusion des Gehirns zu verkürzen. Die Ursache dafür ist darin zu sehen, dass sich die Zeiten bis zum Eintreffen des Notarztes verkürzen und dass die kardiopulmonale Reanimation häufig bereits von Rettungssanitätern durchgeführt werden kann. Zudem hat die Anwendung von rt-PA zur Lyse von zerebralen Thrombembolien Einzug in die Behandlung des Schlaganfalls gehalten (Hacke et al. 1995, Hacke et al. 1999, Morgenstern 1997). Der Schutz des Hirnparenchyms vor schädigenden sekundären Prozessen, die während der Reperfusion stattfinden, stellt damit eine Therapieoption dar, die in der Zukunft auch in der klinischen Situation angewendet werden könnte.

4.1.4 Dauer der Ischämie

In den hier beschriebenen Versuchen wurde die Ischämiedauer auf 15 Minuten festgelegt. Die beidseitige Karotisokklusion von drei Minuten Dauer kann bereits beim Gerbil den Verlust von Nervenzellen in selektiv vulnerablen Arealen auslösen (Kato et al. 1992). Beträgt die Dauer der Ischämie 5-20 Minuten, so lässt sich regelmäßig der Untergang von Neuronen in den selektiv vulnerablen Regionen, dem Hippocampus, dem Striatum und der Schicht 5 des Kortex nachweisen. Weber und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach 15 Minuten globaler Ischämie und 14 Tagen Reperfusion in dem CA1 Sektor 86,6%, dem CA2/3 Sektor 37,3% und im CA3 Sektor 27,4% der Neuronen zu Grunde gingen. Bei einer weiteren Gruppe von Gerbils wurden die Gehirne bereits früher als nach Ablauf der 14 Tage gewonnen, wenn die Tiere sich in einem moribunden Zustand befanden. Diese Tiere wiesen einen verstärkten Nervenzellverlust um 85,2% im CA2/3 Sektor und um 79,7% im CA3 Sektor auf. Der Verlust an Neuronen korreliert dabei mit der Sterblichkeit (Weber et al. 1988). Als prognostisch wichtiges Kriterium wurde der postischämische Gewichtsverlust der Tiere erkannt (Weber 1989). Das Überleben der Tiere konnte nach 15-minütiger Ischämie therapeutisch beeinflusst werden (Stummer et al. 1995). Die zitierten Untersuchungen zeigen, dass bei einer Ischämiedauer von 15 Minuten die Morbidität und Mortalität der Gerbils als Zielparameter Relevanz besitzen und eine therapeutische Beeinflussung möglich ist.

4.1.5 Anästhesie

Für die Untersuchung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie war es erforderlich, die Tiere über einen Zeitraum von etwa sechs Stunden (inkl. Präparation und Wundverschluss) in Narkose zu halten. Die maschinelle Beatmung der Wüstenrennmäuse ist nicht praktikabel, da das geringe Blutvolumen (etwa 4 ml) es nicht erlaubt, regelmäßige Blutgasanalysen durchzuführen, ohne den Makro- und Mikrohämatokrit zu beeinflussen. Die Anästhesie sollte daher in Spontanatmung möglich sein und eine gute Steuerung erlauben. Halothan bot sich als volatiles Anästhetikum an. Es flutet schnell an und ab, ist

einfach zu handhaben und relativ preisgünstig. Die Analyse des arteriellen Blutdrucks während der gesamten Narkosedauer zeigte, dass ein mittlerer Blutdruck von über 70 mmHg in allen Gruppen erreicht wurde, die kreislaufdepressive Eigenschaft von Halothan damit im akzeptablen Bereich lag.

Als ein gewisser Nachteil aller volatilen Anästhetika muss deren Einfluss auf die Ausbildung des ischämischen Gewebeschadens angesehen werden. Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen wiesen darauf hin, dass die Narkose mit Halothan die Nekrosegröße nach einer fokalen zerebralen Ischämie verringern kann (Saito et al. 1997, Sarraf et al. 1999, Warner et al. 1993, Warner et al. 1991). Für diese neuroprotektive Wirkung wurde die Verminderung von endogenen Katecholaminen durch die inhalativen Narkotika verantwortlich gemacht (Hoffman et al. 1993). Saito und Mitarbeiter wiesen nach, dass Halothan zur Reduktion der Häufigkeit von Spreading-Depression-ähnlichen EEG-Veränderungen im perifokalen Bereich bei Okklusion der A. cerebri media bei Katzen führte (Saito et al. 1997). Da Spreading Depressions den Energiebedarf der Nervenzellen erhöhen und zur Vergrößerung des ischämischen Hirnschadens beitragen, könnte die Hemmung der Spreading Depressions neuroprotektiv wirken. Auch die Senkung des zerebralen Metabolismus sowie des ATP Verbrauchs während der Anästhesie mit Halothan hat eine neuroprotektive Wirkung (Michenfelder et al. 1975). Der Nervenzellschaden nach einer zerebralen Ischämie wird durch Fentanyl, alpha-Chloralose und Ketamin in geringerem Maße beeinflusst, allerdings wurde von der Anwendung dieser Medikamente wegen ihrer längeren Halbwertszeit und damit geringeren Kontrollierbarkeit Abstand genommen.

Halothan beeinflusst nicht nur den ischämischen Nervenzellschaden, sondern wirkt auch auf die zerebrale Vasoreaktivität. König und Mitarbeiter beschrieben, dass die Insufflation von Halothan zu einer pialen Vasodilatation um 10-20% des Ausgangswertes führte (Koenig et al. 1993). Smith und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von Halothan auf die regionale zerebrale Durchblutung bei Hunden. Eine Steigerung des Anteils von Halothan in dem Inhalationsgas von 0,8 über 1,5 auf 2,1% hatte eine Erhöhung der Durchblutung von 100% auf 140% und 200% zur Folge. Des weiteren beobachteten sie

eine Abnahme der regionalen zerebralen Durchblutung im Lauf eines fünfstündigen Experiments auf etwa 50% des Ausgangswertes (Smith et al. 1973). Diese Ergebnisse konnten von Boarini et al. bestätigt werden (Boarini et al. 1984). Diese Arbeitsgruppe beobachtete zudem, dass es während der Gabe von Halothan im Lauf von Stunden zu einer Erhöhung des zerebralen vaskulären Widerstandes kommt. Ergebnisse von Brussel et al. weisen darauf hin, dass die Autoregulation der zerebralen Durchblutung durch Halothan außer Kraft gesetzt wird und dass die zerebrale Durchblutung nurmehr vom zerebralen Perfusionsdruck abhängig ist (Brussel et al. 1991).

Die dargestellten Nebenwirkungen von Halothan müssen bei der Bewertung der Ergebnisse bezüglich Nervenzellschaden und Durchblutung beachtet werden. Die Dauer der Narkose und der Volumenanteil von Halothan wurden in allen Gruppen kontrolliert und auf gleichem Niveau gehalten. Der mittlere arterielle Blutdruck war in den Gruppen gleich hoch. Die Untersuchung der Effekte des PAF-Antagonisten und der Bradykinin-Antagonisten auf die zerebrale Durchblutung und den Neuronenschaden nach einer globalen zerebralen Ischämie ist daher in vollem Umfang möglich.

4.2 Untersuchung der Mikrozirkulation

Die zerebrale Mikrozirkulation wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer direkten Untersuchungsmethode, der Intravitalmikroskopie, beobachtet. Der Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes erlaubte die quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser, der Leukozyten-Endothelinteraktionen, der funktionellen Kapillardichte sowie die semiquantitative Analyse der lokalen mikrovaskulären Durchblutung und die qualitative Bestimmung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke. Die Beobachtungen wurden an elf Untersuchungszeitpunkten vorgenommen, um die Dynamik der Veränderungen in der frühen Reperfusionphase beschreiben zu können. Nur die Methode der Intravitalmikroskopie lässt es zu, diese große Anzahl an Parametern *in vivo* ohne Verletzung des Gewebes zu untersuchen. Wie schon beschrieben, ist es möglich,

die Tiere nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung wieder erwachen zu lassen, was danach die Untersuchung des postischämischen Verhaltens und des Nervenzellschadens ermöglicht.

Der Durchmesser zerebraler Gefäße kann auch *in vitro* untersucht werden. Allerdings entspricht die Lagerung der Gefäße in einem Organbad nicht den Verhältnissen, wie sie *in situ* vorliegen. Durch das Herausschneiden des Gefäßes geht dessen Innervation verloren. Lokale Faktoren, die die Aktivität der Gefäßmuskulatur beeinflussen (Histamin, Bradykinin, Serotonin, NO, uvm.), können im Organbad nicht oder nur mit sehr hohem Aufwand kontrolliert werden. Die genannten Faktoren, insbesondere die Konzentration vasoaktiver Substanzen wurden durch die Präparation des geschlossenen Schädelfensters nicht beeinflusst.

Die schrittweise Evolution der Leukozyten-Endothelinteraktionen mit Margination, Leukozytenrollen und fester Adhärenz kann mittels Intravitalmikroskopie differenziert werden. Die Methode ist auch dafür geeignet, die Dynamik der Aktivierung der Leukozyten über einen längeren Zeitraum hinweg zu untersuchen. Der Nachweis emigrierter Leukozyten ist jedoch mit der Intravitalmikroskopie nicht möglich. Die Extravasation von Leukozyten und die Akkumulation im Parenchym kann *in vivo* mittels Messung der Aktivität der Myeloperoxidase bestimmt werden (Matsuo et al. 1994a). Histologisch wurde mehrfach nachgewiesen, dass Leukozyten nach der fokalen zerebralen Ischämie im Hirnparenchym akkumulieren (Garcia et al. 1994, Hallenbeck et al. 1986). Mit der Histologie ist allerdings keine quantitative Beurteilung des Ausmaßes der Leukozyten-Endothelinteraktionen möglich, weshalb wir uns für die Intravitalmikroskopie entschieden haben.

Mit der Intravitalmikroskopie ist nur die Beobachtung der oberflächlichen, pialen Mikrozirkulation möglich. Es kann keine Aussage über die parenchymale Mikrozirkulation gemacht werden. Piale Gefäße unterscheiden sich jedoch von den tief ins Parenchym ziehenden Gefäßen hinsichtlich der Vasoreaktivität oder der Beschaffenheit der Endothelzellschicht nicht. Exemplarisch wurden von je einem Tier der

Bradykinin-Gruppen elektronenmikroskopische Aufnahmen des Hirnparenchyms angefertigt. Mit der Elektronenmikroskopie sollte keine quantitative Aussage über die Leukozyten-Endothelinteraktionen erfolgen. Auf den Aufnahmen war allerdings erkennbar, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen auch in parenchymalen Gefäßen vorlagen.

Die Beobachtung der Hirnoberfläche auf mikroskopischer Ebene ist prinzipiell im Durch- oder Auflichtverfahren möglich. Pawlik et al. stellten 1981 eine Untersuchung kortikaler Kapillaren und Yamakawa und Mitarbeiter 1987 eine Untersuchung zum Verhalten weißer Blutzellen während hämorrhagischer Hypotension bei Katzen in Transilluminationstechnik vor (Pawlik et al. 1981, Yamakawa et al. 1987). Die Verwendung eines intrakortikalen Mikrotransilluminators verursachte jedoch eine traumatische Gewebeerstörung, eine Öffnung der BHS, Ödemformation, Mikroblutungen und eine vermehrte Wärme-Produktion. Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Epiillumination-Mikroskopie treten diese Probleme nicht auf.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine relativ neue Technik, die 1989 erstmals von Villringer et al. zur *in vivo* Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation an Ratten eingesetzt wurde (Villringer et al. 1989). Gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie hat die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ein erhöhtes räumliches Auflösungsvermögen. Damit ist auch die Analyse von Leukozyten-Endothelinteraktionen durch die intakte Dura mater realisierbar, wie die Arbeitsgruppe um Pfister in Rattenmodellen der Pneumokokkenmeningitis nachgewiesen hat (Lorenzl et al. 1996). Begrenzt sind die Möglichkeiten der konfokalen Laser-scanning-Mikroskopie v.a. durch das geringe zeitliche Auflösungsvermögen. Die durchschnittliche Akquirierung eines zweidimensionalen Bilds dauert bei voller Auflösung eine Sekunde und kann durch die Minimierung der Anzahl der Bildpunkte auf 1/16 Sekunde reduziert werden. Eine Evaluation der Dynamik der Leukozyten-Endothelinteraktion und des mikrovaskulären Flusses ist nicht möglich. Deshalb wurde der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie der Vorzug gegeben.

Die Fluoreszenzmarkierung von Leukozyten erfolgte mit Rhodamin 6G *in vivo*. So konnte eine Aktivierung der Blutzellen, wie sie während deren Markierung *in vitro* und Reinfusion zu beobachten ist, vermieden werden (Hamblin et al. 1992 und Nash et al. 1988). Rhodamin 6G wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt als Bolus i.v. injiziert. Damit war sicher gestellt, dass jederzeit der Großteil aller Leukozyten suffizient angefärbt war (Baatz et al. 1995).

Die Fluoreszenzmarkierung des Plasmas mit FITC-konjugiertem Dextran mit einem Molekulargewicht von 150 000 Dalton ist eine weit verbreitete Methode. Durch den Einsatz nur geringer Mengen an Dextran (0,1 ml einer 0,5% Lösung) konnte ein hämodiluerender Einfluss ausgeschlossen werden. Die Emmissionsintensität des markierten Plasmas war nach einmaliger Gabe des Farbstoffs vom Anfang der Beobachtungsphase bis zum Ende des Versuchs ausreichend hoch. Die Extravasation des Farbstoffs ins Hirnparenchym war aufgrund der Größe des Dextranmoleküls auch am Ende des Experiments, mehr als vier Stunden nach dessen Infusion, nicht zu beobachten.

Um phototoxische Effekte und das Ausbleichen der Farbstoffe gering zu halten, wurden die Belichtungszeiten auf 40 Sekunden pro Messgebiet und Messzeitpunkt reduziert. Die hochempfindliche SIT-Restlichtkamera in Verbindung mit einem 25x Salzwasserimmersionsobjektiv erlaubte die Verwendung von Erregerlicht geringer Intensität. Eine Störung der Blut-Hirnschranke, die als sensitiver Marker photochemischer Schädigung gilt (Miller et al. 1992), konnte in nur drei Tieren der Versuchsreihe mit dem PAF-Antagonisten in Hochdosis beobachtet werden. Diese Schäden lagen allerdings großflächig vor und nicht, wie es bei der phototoxischen Schädigung zu erwarten gewesen wäre, lokal bei den Aufnahmearealen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Öffnung der Blut-Hirnschranke ischämischer Genese war.

Aufgrund der begrenzten Schärfentiefe des verwendeten optischen Systems konnten in großvolumigen Venolen ab etwa 40 μm Durchmesser nicht alle rollenden oder frei fließenden Zellen erfasst werden, ebenso wenig war eine simultane Darstellung der gesamten Endotheloberfläche möglich. Daher wurde die Anzahl von Rollern und fest

adhärenten Leukozyten als Anzahl pro 100 μm langem Gefäßsegment und Minute angegeben und nicht als Zellen pro Gefäßoberfläche wie in anderen Publikationen beschrieben. Aus diesen, aber auch den in den nachfolgenden Ausführungen genannten Gründen, wurden der Leukozytenflux und Mikroleukokrit nicht berechnet.

Die Geschwindigkeit von Leukozyten oder Erythrozyten in den pialen Gefäßen konnte nicht bestimmt werden. Zwei Gründe waren ausschlaggebend: Erstens ist die Geschwindigkeit des Blutes in pialen Arteriolen und Venolen so hoch, dass sie mit dem vorhandenen Auswertesystem nicht messbar war. Bei der gegebenen Vergrößerung und der Bildaufzeichnungsrate des PAL-Formates von 50 Halbbildern pro Sekunde ist es möglich, verlässlich Geschwindigkeiten mit der Line-Shift-Diagramm- oder der Bild-zu-Bild-Methode bis zu 2 mm/s zu messen. Die Geschwindigkeit der zentralen Blutsäule pialer Gefäße ist jedoch weit höher. Einen Anhalt für die Geschwindigkeit von Erythrozyten in pialen Arteriolen gibt eine Arbeit von Ma et al. (Ma et al. 1974). Sie bestimmten die Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom für unterschiedliche Gefäßdurchmesser: 6,8 μm , 5,8 mm/s; 13,7 μm , 8,6 mm/s; 23,5 μm , 13,8 mm/s und 49 μm , 26,3 mm/s. Ohne Kenntnis der Fließgeschwindigkeit ist keine Berechnung der Scherrate möglich und somit auch nicht die Berechnung der kritischen Leukozytengeschwindigkeit, bei der die Geschwindigkeit nicht mehr allein durch das parabolische Geschwindigkeitsprofil in engen Röhren beschrieben werden kann (Gaehtgens et al. 1985). Die Differenzierung zwischen einem im Randstrom frei fließenden Leukozyten und einem rollenden, also einem Leukozyten, der bereits eine Leukozyten-Endothelinteraktion eingeht, musste daher mit dem freien Auge durchgeführt werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde definiert, dass ein Leukozyt, der länger als 20 Sekunden bewegungslos randständig am Endothel anhaftet, ein fest adhärenter Leukozyt ist. Diese Definition wurde in verschiedenen Untersuchungen z. B. am Gehirn und Mesenterium auf 5-60 Sekunden festgelegt (Atherton et al. 1973, Dirnagl et al. 1994, Villringer et al. 1989).

4.2.1 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Verschiedene Reize auf die zerebrale Mikrozirkulation bewirken eine Aktivierung und Extravasation von neutrophilen Leukozyten und damit eine Akkumulation im Hirnparenchym. Nicht nur die Abwehr von Krankheitserregern wie z.B. bei der Meningitis, sondern auch eine zerebrale Ischämie oder ein Trauma verursachen diese Entzündungsreaktion. Im Parenchym können Leukozyten freie Radikale und Proteasen in ihre Umgebung abgeben und deshalb nicht nur Krankheitserreger oder nekrotisches Material abräumen, sondern auch vitales Gewebe schädigen (Kubes et al. 1995, Schmid-Schönbein und Engler 1990). Die Extravasation von neutrophilen Leukozyten läuft über eine Kaskade von vier Schritten ab, der Margination, dem Rollen, der festen Adhärenz und der Extravasation (Abbildung 41).

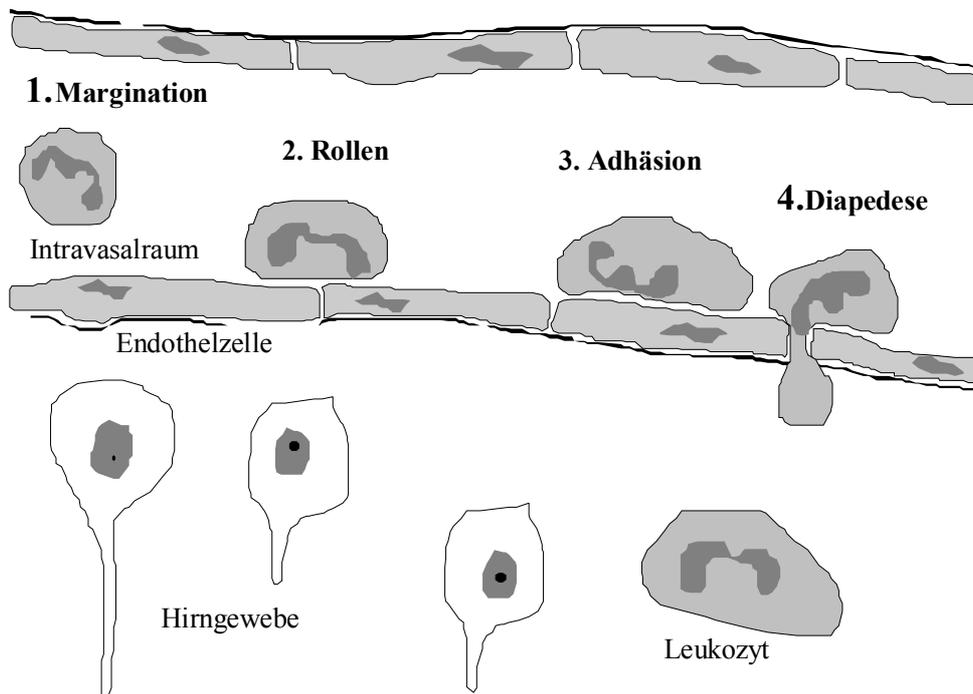


Abbildung 44: Die vier konsekutiven Schritte der Emigration von Leukozyten in das Gewebe sind die Margination, das Rollen, die feste Adhärenz und die Diapedese (aus Springer 1990).

Am Anfang steht die Margination; die Leukozyten verlassen den Zentralstrom und fließen in der Nähe des Endothels. Leukozyten sind große Blutzellen und tendieren dazu, bei hohen Fließgeschwindigkeiten im Zentralstrom eines Gefäßes zu fließen. Bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten und damit niedriger Scherrate findet eine Agglutination von Erythrozyten statt, wodurch dieser korpuskuläre Anteil des Bluts an Größe zunimmt und nun die Leukozyten weiter an den Rand des Gefäßes verdrängt (Nobis et al. 1985).

Daraufhin kommen diese Zellen in Kontakt mit dem Endothel; Adhäsionsmoleküle, insbesondere die Selektine, bewirken das Rollen von Leukozyten am Endothel (Vestweber et al. 1999).

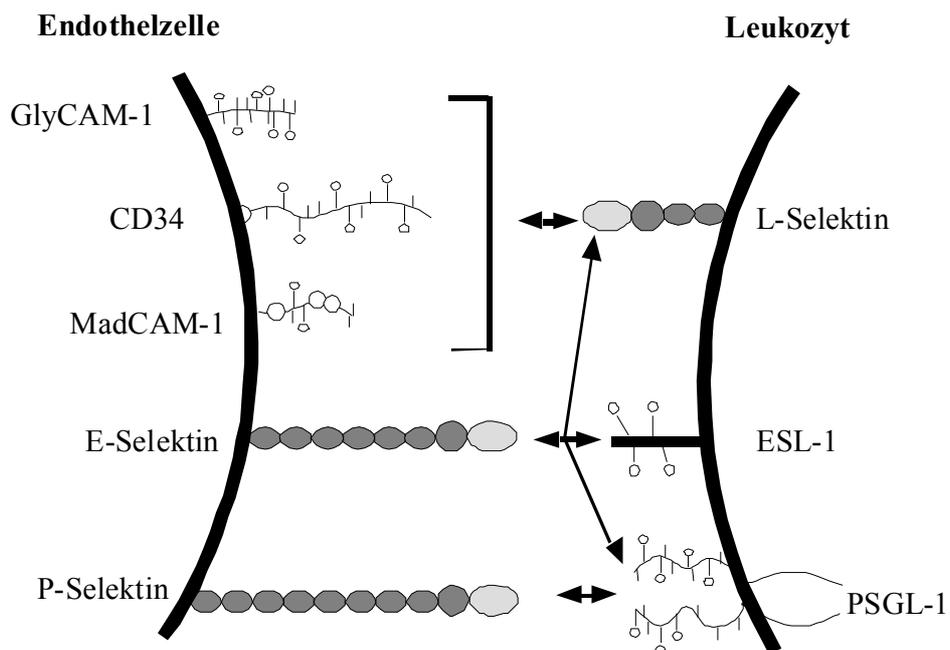


Abbildung 45: Drei verschiedene Selektine sind derzeit bekannt, die für das Rollen von Leukozyten verantwortlich gemacht werden. Das für die Bindung von neutrophilen Leukozyten wichtige P-Selektin, das in Weibel-Palade-Körpern der Endothelzelle gelagert wird und auf einen Reiz hin an der Oberfläche präsentiert wird, bindet an PSGL-1 des Leukozyten. GlyCAM-1: glycosylation-dependent cell adhesion molecule, MadCAM 1: mucosal addressin cell adhesion molecule, ESL-1: E-Selektin Ligand, PSGL-1: P-Selektin Glycoprotein Ligand. Modifiziert nach Vestweber et al. 1999.

Während des Leukozyten-Rollens können chemische Lockstoffe wie z.B. TNF, IL1b, PAF, Bradykinin, Endothelin und viele mehr auf den Leukozyten einwirken (Ahluwalia et al. 1996, Stanimirovic und Satoh 2000). Diese proinflammatorischen Mediatoren werden vom Parenchym und Gefäßendothel freigesetzt. Das Endothelium wird dabei durch eine molekulare und phenotypische Kaskade verändert, die durch aktivierte Mikroglia und ansässige perivaskuläre/parenchymale Makrophagen angestoßen wird (Giulian 1990 und Stoll 1998). Die Aktivierung mit Chemoattractants ist gefolgt von einer Konformationsänderung von Cluster of differentiation (CD)- Oberflächenmolekülen und dadurch der Adhäsivität der Integrine. Die aktive Form der Integrine bindet an Moleküle der Ig-Superfamilie. Dies hat eine feste Adhäsion des Leukozyten an das Endothel zur Folge. Mit

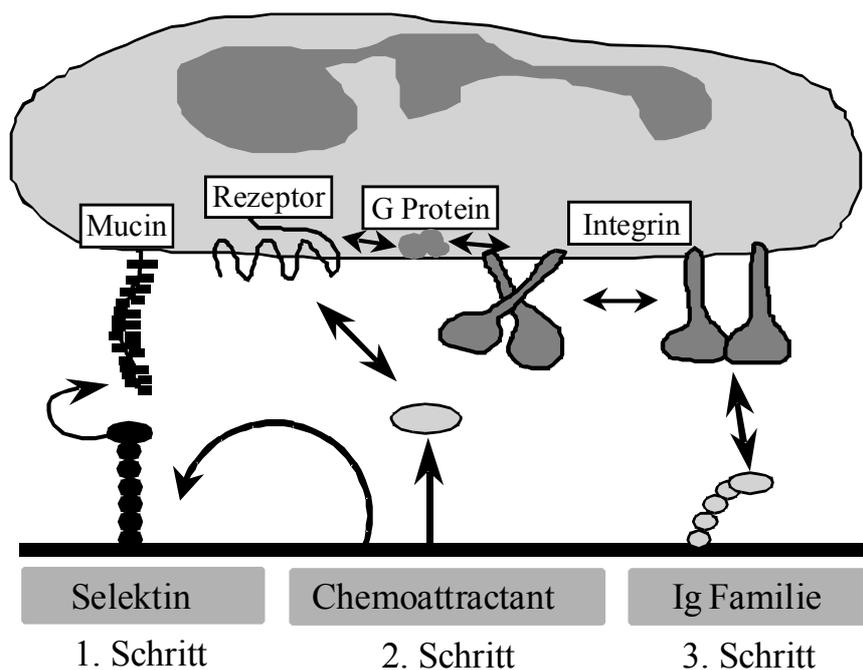


Abbildung 46: Das Leukozytenrollen der Leukozyten-Endothelinteraktion wird durch Selektine und die feste Adhärenz durch Integrine vermittelt. Während des Rollens können Chemoattractants zwischen Leukozyt und Endothel wechselwirken, was die Konformationsänderung von Oberflächenmolekülen des Leukozyten bewirkt, wodurch dann die aktive Form des Integrins induziert wird. Modifiziert nach Springer 1995.

Hilfe dieser Integrin- und Ig-Superfamilien-bindung und entlang eines Gradienten von Chemoattractants kann dann der Leukozyt durch die Endothelschicht hindurchtreten und ins Gewebe einwandern (Springer 1995).

4.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Leukozyten können das Hirngewebe prinzipiell über zwei Wege schädigen. Wird das Kapillarlumen durch Leukozyten verlegt, so resultiert daraus eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Im vorherigen Kapitel wurde die Extravasation von Leukozyten und deren Akkumulation im Hirnparenchym besprochen. Leukozyten können im Hirngewebe nicht nur nekrotisches Material abbauen, sondern auch durch die Freisetzung von freien Radikalen und proteolytischen Enzymen noch intaktes Gewebe schädigen. In diesem Kapitel soll deutlich gemacht werden, dass sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach 15-minütiger Ischämie nahezu alle Kapillaren perfundiert werden und eine verminderte zerebrale Durchblutung mit einer verminderten Fließgeschwindigkeit des Bluts in den Kapillaren einhergeht, der Verschluss von Kapillaren, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Kapillarperfusion ist in verschiedenen Organen unterschiedlich gesteuert. Das klassische Konzept von A. Krogh besagt, dass bei verminderter Durchblutung eines Organs präkapilläre Sphinkter verschlossen werden und nur noch Kurzschlüsse geöffnet sind. Steigt der Blutbedarf eines Organs an, so werden alle Sphinkter geöffnet, was zu einer homogenen Durchblutung aller Kapillaren führt (Krogh 1919). Dabei muss angemerkt werden, dass Krogh die Mikrozirkulation der Zunge von Fröschen untersucht hat. Im Zerebrum muss von einer anderen Regulierung ausgegangen werden. Wird die zerebrale Durchblutung bei Ratten mittels Hyperkapnie erhöht, so konnte bei gleichbleibenden mittleren Kapillardurchmessern eine Homogenisierung der Erythrozytenfließgeschwindigkeiten beobachtet werden (Villringer et al. 1994). Bereits zuvor war durch die Arbeitsgruppe von Kuschinsky gezeigt worden, dass Hyperkapnie mit dem Fehlen einer Rekrutierung von Kapillaren verbunden ist. Steigt also die Durchblutung

in einem Hirnareal, so erhöht sich die Blutfließgeschwindigkeit und damit die Durchblutung in zuvor langsamer durchbluteten Kapillaren, "capillary recruitment", wie es Krogh bei der Zunge von Fröschen beschrieben hat, liegt im Gehirn nicht vor (Gaetgens 1991, Gobel et al. 1990, Gobel et al. 1991, Williams et al. 1993). Gut erklärbar ist damit auch, dass Hirnareale mit hohem Metabolismus eine hohe Durchblutung aufweisen und zu deren Ermöglichung eine hohe Kapillardichte vorhanden ist (Klein et al. 1986). Auch nach einer globalen und fokalen Ischämie ist die Durchblutung jeder einzelnen Kapillare weitgehend erhalten, die verminderte zerebrale Durchblutung resultiert nicht aus dem Verschluss von einzelnen Kapillaren, sondern ist die Folge der verminderten Geschwindigkeit der Perfusion aller Kapillaren (Theilen et al. 1993, Theilen et al. 1994).

Ames et al. beschrieben 1968 das "no-reflow"-Phänomen während der Reperfusion nach einer zerebralen Ischämie. Bei Kaninchen wurde die zerebrale Ischämie durch Abklemmen beider Karotiden und das Anlegen einer Halskrawatte, die mit einem Druck von 350 mmHg aufgeblasen wurde, induziert. Nach 2½, 5, 7½, 10 und 15 Minuten Ischämie wurden beide Karotiden kanüliert und eine Druckinfusion von 120 mmHg mit Tinte gestartet. Für die histologische Auswertung wurden die Gehirne fixiert und geschnitten. Areale, in die keine Tinte gelangte, erschienen hell im Gegensatz zu perfundierten Arealen, die dunkel erschienen. Mit steigender Dauer der Ischämie nahmen Perfusionsdefekte zu; bei 15-minütiger Ischämie waren 95% der Schnittfläche hell und damit nicht perfundiert ("from pinhead to 95% of the brain mass"). Gehirne, bei denen eine "blutlose Ischämie" induziert wurde, d.h. das Gehirn vor Induktion der Ischämie mit Kochsalzlösung perfundiert wurde, zeigten keinen Perfusionsausfall während der Füllung mit Tinte. Die Autoren diskutierten daher, dass die Okklusion zahlreicher Kapillaren mit Blutzellen für den pathophysiologischen Zustand des "no-reflow-phenomenon" verantwortlich sein könnte (Ames et al. 1968). Ursächlich für die Kapillarokklusion nach einer zerebralen Ischämie können die Verminderung des Kapillardurchmessers durch Schwellung von Endothelzellen, die Bildung von Protrusionen der Endothelzellmembran und die Schwellung von Gliazellen mit Ausbildung eines Hirnödems sein (Chiang et al. 1968, Kempinski et al. 1997). Allerdings kann auch eine Versteifung des Zytoskeletts des

aktivierten Leukozyten zum Festsetzen der weißen Blutzelle beitragen. Die Ergebnisse von Ames et al. wurden vielfach angezweifelt, weshalb de la Torre und Mitarbeiter die Versuche an Ratten wiederholten (de la Torre et al. 1992). Die Autoren konnten zeigen, dass die mangelnde Füllung von Hirnarealen mit Tinte einen methodischen Artefakt darstellt. Die Infusion von Tinte in die Karotiden nach der Thorakotomie erzeugte Perfusionsdefekte, wobei die intravenöse Gabe der Farbstoffes *in vivo* zu einer homogenen Anfärbung des gesamten Gehirns führte.

Gerbils wurden ebenfalls auf das Vorhandensein des "no-reflow-phenomenon" hin untersucht, wobei Tiere mit bilateraler Karotisokklusion mit Tieren verglichen wurden, bei denen zuvor mit Cyclophosphamid eine Leukopenie erzeugt worden war. Weder die Inzidenz noch das Ausmaß fehlender Kapillarperfusion unterschieden sich bei den beiden Gruppen, was eine ursächliche Beteiligung von Leukozyten am "no-reflow-phenomenon" in Frage stellt (Aspey et al. 1989). Auch die Experimente von anderen Wissenschaftlern konnten die Beobachtungen von Ames nicht bestätigen (Fischer et al. 1977, Harrison et al. 1975, Levy et al. 1975). Die Untersuchung der Perfusion von Kapillaren nach einer globalen Ischämie bei Ratten zeigte, dass nach 15 Minuten Ischämie in der Reperfusionphase alle Kapillaren durchblutet waren, nach 30 Minuten Ischämie allerdings einige Areale mit nicht perfundierten Kapillaren zu sehen waren (Theilen et al. 1993). Die fokale Ischämie (Verminderung der Durchblutung des Kortex um 75%) für die Dauer von einer Stunde verursachte ebenfalls nur sehr selten einen Ausfall der Perfusion von Kapillaren (Theilen et al. 1994). Werden die Ergebnisse zusammenfassend betrachtet, dann scheint das "no-reflow-phenomenon" nach einer Ischämie von kurzer Dauer und geringem Durchblutungsabfall von untergeordneter Bedeutung zu sein. Wird die Dauer der Ischämie oder die Verminderung der Durchblutung allerdings ausgedehnt, dann tritt dieses Phänomen in größerem Ausmaß auf (Hossmann 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Kapillardichte an jedem Messzeitpunkt bestimmt. Die Intravitalmikroskopie ist die einzige Methode, mit der die Messung der funktionellen Kapillardichte beliebig oft wiederholt werden kann und damit auch die

einzigste Methode, mit der die Dynamik einer möglichen Veränderung dieses Parameters in einer längeren Zeitspanne im selben Tier gemessen werden kann.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen der funktionellen Kapillardichte werden weiter unten im jeweiligen Kapitel ausführlicher besprochen.

4.2.3 Mikrovaskuläre Durchblutung

Die lokale Durchblutung des Kortex wurde durch die Messung der arteriovenösen Transitzeit (AVTT) bestimmt. Diese Messung erlaubt keine Aussage über die absolute Durchblutung, es kann lediglich die Durchblutung in einem Areal relativ zum Ausgangswert angegeben werden.

Für die Messung der AVTT wurde der Farbstoff Rhodamin 6 G injiziert. Die hohe Lipophilie und das geringe Molekulargewicht des Farbstoffs sind dafür verantwortlich, dass auch nach mehrmaliger Applikation die Strahlungsintensität im Hintergrund nur geringfügig ansteigt. Wiederholte Messungen waren somit technisch ohne Einschränkung der Qualität möglich. Die absoluten Werte der AVTT, die in den vorliegenden Experimenten vor der Ischämie bei durchschnittlich 0,6 Sekunden lagen, wurden bereits von Rovainen et al. beschrieben (Rovainen et al. 1993). Er untersuchte die AVTT bei Mäusen und injizierte dazu FITC-Dextran, womit eine AVTT von 0,65 Sekunden gemessen wurde. Bei der Injektion von fluoreszierenden Partikeln mit einem Durchmesser von 1,3 μm oder von physiologischer Kochsalzlösung zur Senkung des Hämatokrits war die AVTT 0,6 Sekunden bzw. 0,35 Sekunden lang. Er konnte damit zeigen, dass Plasma und Partikel geringer Größe im Blutgefäßsystem langsamer fließen als Partikel größeren Volumens, die Erythrozyten. Dieses Phänomen ist gut mit dem parabolischen Geschwindigkeitsprofil in schmalen Zylindern zu erklären. Betrachtet man die Ergebnisse von Rovainen und Mitarbeitern, so darf man davon ausgehen, dass auch mit der Injektion von Rhodamin die Transitzeit von Plasma bestimmt wurde.

4.3 Neurologisches Defizit, Überleben und Gewicht

Sterblichkeit und Grad der Behinderung sind die beiden wichtigsten primären Endpunkte jeder klinischen Schlaganfallstudie. Bei experimentellen Untersuchungen der fokalen zerebralen Ischämie wird meist die Infarktgröße und bei Modellen der globalen zerebralen Ischämie meist der selektive Nervenzelluntergang als Zielgröße gewählt und nur selten eine Aussage über die Sterblichkeit oder neurologische Ausfallserscheinungen getroffen. Dabei wird außer Acht gelassen, dass aufgrund der komplexen Anatomie des humanen zentralen Nervensystems kein direkter Zusammenhang zwischen Infarktgröße und resultierender Behinderung besteht. Kleine Läsionen an strategisch wichtigen Stellen wie der Capsula interna oder den Spracharealen nach Wernicke oder Broca im Temporal- bzw. Frontallappen können schwerste Folgen, wie motorische Lähmungen oder Sprachstörungen, verursachen. Diese Schäden können zum Verlust von Arbeitsfähigkeit, Kommunikation und Selbstständigkeit führen und mit zum Teil lebenslänglicher Abhängigkeit und Pflegebedürftigkeit der Betroffenen einhergehen. Läsionen des Hippocampus, einer bei der globalen zerebralen Ischämie empfindlichen Struktur sind oft mit gravierenden Störungen der Gedächtnisfunktion verbunden, die eine selbstständige, unabhängige Lebensführung unmöglich machen. Dagegen sind große Verluste von Hirngewebe im Bereich des Frontallappens unter Umständen nur durch eingehende neuropsychologische Tests zu erkennen. In tierexperimentellen Untersuchungen zur Pharmakotherapie der zerebralen Ischämie ließ sich auf der einen Seite zeigen, dass eine morphologische Protektion mit einer Reduktion funktioneller Defizite vergesellschaftet sein kann (Block et al. 1997, Katsuta et al. 1995). Auch wurde eine positive Korrelation zwischen dem neurologischen Defizit und dem Ausmaß des Nervenzellschadens beschrieben (Garcia et al. 1995). Auf der anderen Seite wurde eine morphologische Protektion ohne Auswirkung auf das Verhalten und eine Verbesserung funktioneller Parameter ohne gleichzeitige Reduktion des Gewebes Schadens nachgewiesen (Minato et al. 1997, Smith und Meldrum 1995). Es müssen auch nicht alle durch eine Ischämie hervorgerufenen Defizite einen lichtmikroskopisch nachweisbaren Schaden zur Folge

haben (Block und Schwarz 1998). Diese Erfahrungen machen deutlich, dass als Ergänzung zu den morphologischen Untersuchungen funktionelle Tests sinnvoll und notwendig sind.

Die tägliche Erhebung des Neuroscores anhand des Testprotokolls war einfach und schnell durchzuführen. Mit den einzelnen Testaufgaben wurden verschiedene anatomische Strukturen sowie deren afferente und efferente Verbindungen getestet (Tupper und Wallace 1980). Die Gleichgewichtsprüfung auf der schiefen Ebene testet Pons und Mesencephalon. Für die Greifreflexe (Fremdreflexe) ist ein intaktes motorisches Areal in der Großhirnrinde erforderlich, ebenso für das Strecken der Vorderpfoten. Einen Ausrichtreflex auf der Ebene von Pons und Mesencephalon stellen das Drehen des Kopfes entgegen dem aktiv gebeugten Rumpf und das Umdrehen aus Rückenlage dar. Der Fallreflex prüft wiederum den Kortex unter Einbeziehung der Sehbahn. Medulla, Pons und das obere Halsmark werden mit den Korneal- und Pinnareflexen geprüft. Circling oder Haltungsanomalien des Rumpfes von Gerbils weisen eine Hemiparese nach, sind aber weniger stark lokalisatorisch zu verwerten. Die lokomotorische Aktivität (Spontanmotilität) ist u.a. stark von der Integrität des Hippocampus abhängig (Glickman et al. 1970), während speziesspezifische Aktivitäten wie das Nagen an Pappe die Integrität des Zentral-Nervensystems nur global prüfen können.

Nach einer globalen zerebralen Ischämie ist ein Gewebeschaden zunächst nur im direkt betroffenen Großhirn zu erwarten. Mechanismen wie z.B. die einem Hirnödem folgende Minderung der zerebralen Durchblutung können den Schaden auf weiter rostral gelegene Strukturen ausdehnen. Um dies zu prüfen, schloss die neurologische Untersuchung Pons, Mesencephalon und oberes Halsmark mit ein.

Als das wichtigste Maß für den Hirnschaden bei Wüstenrennmäusen nach einer globalen zerebralen Ischämie darf die Überlebenszeit angesehen werden. Experimente, bei denen Gerbils ebenfalls einer globalen zerebralen Ischämie von 15 Minuten Länge unterzogen wurden, zeigten, dass nach vier Tagen 16 %, nach acht Tagen 44 % und nach 14 Tagen 54 % der Tiere verstorben waren (Weber 1989). In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass Gehirne von Gerbils, die einen moribunden Gesamteindruck machten (starker

Gewichtsverlust, rauhes Fell und Einstellung jeglicher körperlichen Aktivität) einen starken Nervenzellschaden im Hippocampus aufwiesen, d.h. dass ein ausgeprägter Nervenzellschaden mit dem Leben nicht vereinbar ist (Weber et al. 1988).

Weber et al. berichteten über weitere Experimente, in denen der postischämische Verlust an Körpermasse untersucht wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass moribunde Tiere bereits am dritten Tag nach der Ischämie einen signifikant erhöhten Gewichtsverlust im Vergleich zu Überlebenden zeigten (Weber et al. 1988).

4.4 Histomorphometrie

Bei der Untersuchung des Nervenzellschadens nach der Großhirnischämie wurden nicht nur die selektiv vulnerablen Neurone des CA1 im Hippocampus, des Striatum und der fünften Schicht des Kortex ausgewertet, sondern zusätzlich noch die weiteren hippocampalen Areale und die kortikalen Schichten, wie auch schon durch Stummer und Mitarbeitern erfolgt (Stummer et al. 1994). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei der Beurteilung nur einzelner Hirnareale wichtige Informationen über den Schaden nach der Großhirnischämie bei Gerbils verloren gehen (Stummer et al. 1994).

Die für die Gewebeaufbereitung nötigen Schritte der Fixation, Entnahme und Einbettung der Gehirne, bis hin zum Schneiden und Färben der Präparate können Artefakte bedingen und zu falschen Schlussfolgerungen führen. In schlecht fixierten histologischen Präparaten sind als typischer Artefakt so genannte "dark neurons" beschrieben worden, dunkle Zellen, die morphologisch den dunklen, hyperchromatischen Neuronen ähneln können, die sich nach Beschreibungen von Eke et al. im Endstadium der ischämischen Strukturveränderung befinden (Eke et al. 1990). Die Perfusionsfixation der Tiere nach dem von Brown und Brierley 1968 erstmals beschriebenen Verfahren mit Paraformaldehyd verbessert die Qualität des histologischen Präparats im Vergleich zur Immersionsfixation (Brown und Brierley 1968). So haben wir in Schnitten von nach dieser Methode intrakardial perfusionsfixierten Gerbils ohne ischämischen Insult keine "dark neurons" gesehen. In der

vorliegenden Untersuchung wurden die Schnitte mit Kresyl-Violett nach der klassischen Methode von Nissl zur Beurteilung der Neuronen gefärbt. Crain et al. stellten 1988 dar, dass Färbung mit Hämatoxylin-Eosin oder die Silber-Imprägnation zu vergleichbaren Ergebnissen bei der Analyse der selektiven Nervenzelluntergänge nach der globalen zerebralen Ischämie bei Gerbils führen (Crain et al. 1988). Bei der Zählung der Nervenzellen wurde die von Stummer et al. 1994 ausführlich dargestellte Methode übernommen (Stummer et al. 1994). Stummer und Mitarbeiter beziehen sich dabei auf die Veröffentlichungen von Brown et al. und Eke et al., die genau die morphologischen Kriterien für die Vitalität von Nervenzellen beschrieben haben (Brown et al. 1968 und Eke et al. 1990).

4.5 Platelet-activating factor

Seit der Erstbeschreibung von Platelet-activating factor (PAF) im Jahr 1972 hat diese Substanz als potenzieller Mediator in verschiedenen pathologischen Prozessen Bedeutung gewonnen (Benveniste et al. 1972, Benveniste 1974). Die Einführung von synthetischen und natürlichen spezifischen Antagonisten verlieh der PAF-Forschung Anschub. In experimentellen Untersuchungen sind PAF-Antagonisten effektive Therapeutika des Asthmas, des Schocks, der Anaphylaxie, bei Magen- und Darmulzera, der Psoriasis, beim Schlaganfall und vielen Entzündungsprozessen (Braquet et al. 1987). Mehrere Studien, auf die noch näher eingegangen wird, weisen darauf hin, dass PAF nach der Ischämie/Reperfusion verschiedener Organe einen schädigenden Faktor darstellt und dass die Antagonisierung von PAF den Reperfusionsschaden verringern kann.

4.5.1 PAF im zentralen Nervensystem

PAF ist unter physiologischen Bedingungen im Gehirn von Rindern nachgewiesen worden (Tokumura et al. 1987). Eine PAF-Produktion wurde ebenfalls im Gehirn von Ratten

beschrieben sowie in der Retina von Hühnern (Bussolino et al. 1986, Francescangeli et al. 1989, Kumar et al. 1988). Der genaue Produktionsort von PAF im Gehirn ist nicht bekannt, d.h. es konnte noch nicht differenziert werden, ob Zellen des Gefäßsystems, Neurone oder Gliazellen PAF freisetzen. Nach einer Ischämie/Reperfusion sowohl des Gehirns als auch des Spinalmarks steigt die Produktion von PAF in beiden Teilen des ZNS stark an (Francescangeli et al. 1996a, Francescangeli et al. 1996b, Lindsberg et al. 1990).

Auch Bindungsorte für PAF wurden im Gehirn beschrieben, wobei die höchste Dichte in Mikrosomen beobachtet wurde (Domingo et al. 1988). Aber nicht nur Mikrosomen, sondern auch Zellmembranen von Synapsen tragen PAF-Rezeptoren (Marcheselli et al. 1990). Die höchste Dichte von PAF-Rezeptoren liegt im Hippocampus und im Mittelhirn vor (Domingo et al. 1988). Der PAF-Rezeptor ist ein Protein, dessen Kette die Zellmembran schleifenförmig siebenmal durchbricht. Der Rezeptor ist an ein G-Protein gekoppelt (Chao et al. 1993). Die intrazellulären Reaktionen dieses Rezeptors sind mit denen der Bradykininrezeptoren vergleichbar, welche weiter unten ausführlich beschrieben werden.

PAF wird auf zwei unterschiedlichen Synthesewegen in verschiedenen Geweben und Zellen gebildet. Der "remodeling pathway" reguliert die PAF-Synthese von stimulierten Entzündungszellen (Ninio et al. 1982, Sanchez et al. 1985). Eine Aktivierung der Phospholipase A2 resultiert in der Hydrolyse von Membranphospholipiden, was zur Generierung von 2-Lysophospholipiden führt. Diese Lyso-Produkte dienen der Acetyl-CoA:Acetyltransferase als Substrat, wobei nun PAF generiert werden kann (Albert et al. 1983, Wykle et al. 1980). Der zweite Weg der PAF-Biosynthese, der für das Gehirn quantitativ wichtiger erscheint, ist der "de novo"-Weg (Bussolino et al. 1986). Nach der Synthese von Alkyl-Acetylglyzerol wird dieses Molekül mittels der spezifischen CDP-Cholin:Glyzerolcholinphosphotransferase zu PAF umgesetzt. Die biologische Aktivität von PAF ist abhängig von der Aktivität des katabolischen Metabolismus. Das entscheidende Enzym, welches die PAF-Aktivität limitiert, ist die spezifische PAF-Acetylhydrolase. Dieses Enzym bildet Lyso-PAF und ist im Plasma und in Geweben vorhanden (Blank et al. 1981, Farr et al. 1980).

Kochanek und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die normale endogene Produktion von PAF im Gehirn von Ratten die zerebrale Durchblutung und den Sauerstoffmetabolismus nicht beeinflusst (Kochanek et al. 1990). Wichtige Hinweise auf die Bedeutung von PAF unter pathophysiologischen Bedingungen geben Versuche aus der selben Arbeitsgruppe. Die Infusion von PAF in die A. carotis von Ratten resultierte in einem Abfall des systemischen Blutdrucks sowie der zerebralen Durchblutung und in einer Steigerung des zerebralen Sauerstoffmetabolismus (Kochanek et al. 1988). Die Autoren brachten die Wirkung von PAF daher mit der Hypoperfusion und dem Hypermetabolismus in Verbindung, beides Kennzeichen der globalen zerebralen Ischämie.

4.5.2 Platelet-activating factor bei zerebraler Ischämie

Nach einer Ischämie/Reperfusion sowohl des Gehirns als auch des Spinalmarks steigt die Produktion von PAF in beiden Teilen des ZNS stark an (Francescangeli et al. 1996a, Francescangeli et al. 1996b, Lindsberg et al. 1990). Eine globale zerebrale Ischämie bei Gerbils lässt die Bindungsorte für PAF auf etwa das zehnfache des Basalwertes ansteigen. Allerdings sinken diese Werte bereits nach 30 Minuten Reperfusion auch wieder auf die Ausgangswerte ab (Domingo et al. 1994). Als deletäre Effekte von PAF sind eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke (Kumar et al. 1988), Vasokonstriktion (Kochanek et al. 1988), Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase (Catalan et al. 1994), Verstärkung des exzitotoxischen Nervenzellschadens (Prehn et al. 1993), Erhöhung des intrazellulären Kalziums (Zablocka et al. 1995) und Stimulation der Freisetzung von freien Radikalen (Powell 1992) beschrieben. Jeder dieser Effekte allein aber auch die Kombination aus mehreren kann die Ursache einer Verstärkung des Hirnschadens nach der zerebralen Ischämie darstellen.

Der Blockade von Platelet-activating factor mit verschiedenen Antagonisten wurde eine neuroprotektive Eigenschaft zugeschrieben. Spinnewyn et al. therapierten Gerbils nach einer globalen zerebralen Ischämie mit verschiedenen PAF-Antagonisten (BN 52020, BN 52021, BN 52022 und BN 52024) und beobachteten sowohl eine Verminderung des

postischämischen Hirnödems als auch eine Verminderung des neurologischen Defizits der Tiere (Spinnewyn et al. 1987). Eine Reduzierung des morphologischen Zellschadens nach einer globalen Ischämie wurde durch die Gabe von Ginkgolid B, einem PAF-Antagonisten, erreicht. Die Therapie erhöhte die Anzahl vitaler Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus bei Ratten (Oberpichler et al. 1990).

4.5.3 Gefäßdurchmesser

Kontrovers wird der Effekt von PAF auf den Tonus von Gefäßen diskutiert. *In vitro* Untersuchungen an parenchymalen Arteriolen des Gehirns von Ratten konnten keine Wirkung von PAF auf den Gefäßtonus nachweisen (Edwards et al. 1991), ganz im Gegensatz zu Untersuchungen von Uski und Reinstrup (Uski et al. 1990). Die Autoren beobachteten an pialen Arteriolen des Menschen und der Katze, dass PAF, abhängig auch vom basalen Gefäßtonus, in hohen Konzentrationen eine Vasokonstriktion und in niedrigen Konzentrationen eine Vasodilatation bewirkt. Bei Ferkeln konnte intravitalmikroskopisch beobachtet werden, dass die Superfusion des Kortex mit PAF konzentrationsabhängig den Durchmesser von Arteriolen verringert (Armstead et al. 1988). Sowohl die Superfusion der Hirnoberfläche als auch die Infusion von PAF in die A. carotis bei der Ratte hatten bei Untersuchungen von Uhl et al. keine Auswirkung auf den Durchmesser von pialen Arteriolen (Uhl et al. 1999a, Uhl et al. 1999b). In der vorliegenden Versuchsreihe, in der 20 mg/kg WEB 2170 verabreicht wurden, waren die Durchmesser von Arteriolen in der Kontrollgruppe während und nach der Ischämie im Vergleich zum Ausgangswert signifikant verringert. Hingegen war in der Therapiegruppe der Durchmesser nur während der Ischämie vermindert. Der Unterschied zwischen der Kontroll- und der Therapiegruppe war nicht signifikant. In der Versuchsreihe, in der 2 mg/kg WEB 2170 verabreicht wurden, veränderten sich die Durchmesser über den gesamten Zeitraum hinweg weder in der Kontroll- noch in der Therapiegruppe. Als Trend war zu erkennen, dass die Blockade des PAF-Rezeptors der nach der Ischämie vorliegenden, wenn auch gering ausgeprägten, Vasokonstriktion entgegenwirkt.

4.5.4 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Aus Studien an der Backentasche und Rückenhaut des Hamsters und am Mesenterium der Katze ist bekannt, dass PAF die Adhäsion von Leukozyten vermittelt (Duran et al. 1990, Kubes et al. 1990, Lehr et al. 1993). Systematische Untersuchungen von Uhl et al. zeigten, dass die systemische Gabe von PAF in die A. carotis interna Leukozyten-Endothelinteraktionen auslöste, hingegen die topische Gabe mittels Superfusion der Kortexoberfläche nicht zu einer solchen Reaktion führte (Uhl et al. 1999a, Uhl et al. 1999b). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei der topischen Applikation PAF schnell durch die Acetyl-Hydrolase abgebaut wird oder aber die Bindung des Mediators von extraluminal an die Endothelzelle andere zelluläre Reaktionen vermittelt als die intraluminal Bindung. Park et al. untersuchten die Leukozyten-Endothelinteraktionen in pialen Gefäßen von Ferkeln nach neunminütiger Asphyxie. Sie fanden, dass die Therapie mit dem PAF-Antagonisten WEB 2086 die Adhärenz von Leukozyten am Endothel, die durch die Asphyxie aktiviert worden war, hemmte (Park et al. 1999).

Nun stellt sich die Frage, über welche Mechanismen PAF zur Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen beiträgt. Über erste Hinweise berichteten Lorant und Mitarbeiter. Die Autoren stimulierten HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) mit Histamin und Thrombin und beobachteten, dass die Expression sowohl von PAF als auch von P-Selektin gesteigert war (Lorant et al. 1991). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die konsekutiven Schritte der Aktivierung von Leukozyten stark untereinander vernetzt sind und dass schon die Expression eines Moleküls die Expression des nachfolgenden stimuliert. In derselben Veröffentlichung berichten die Autoren, dass PAF die funktionelle Aktivierung der CD11-CD18 Adhäsionsmoleküle von Leukozyten induziert (Lorant et al. 1991). PAF scheint also sowohl die Expression von Selektinen, den Adhäsionsmolekülen, die das Rollen auslösen, als auch die funktionelle Aktivierung der Integrine, der Adhäsionsmoleküle, die die feste Adhärenz vermitteln, zu fördern. PAF ist aber nicht nur Bindeglied und Verstärker des Rollens und der festen Adhärenz von Leukozyten, sondern scheint auch am letzten Schritt der Leukozyten-Endothelinteraktionen, der Emigration der

Leukozyten in das Parenchym, maßgeblich beteiligt zu sein. Darauf weisen Ergebnisse von Nourshargh et al. hin. Die Autoren untersuchten die Wirkung von intraperitoneal verabreichtem IL-1 auf das Rollen, die Adhärenz und die Extravasation von Leukozyten im Mesenterium der Ratte. Die zusätzliche Applikation zweier PAF-Antagonisten (UK-74,505 und WEB 2170) zum Leukozyten-Aktivator IL-1 verminderte die Anzahl extravasierter Leukozyten, hatte allerdings keinen Einfluss auf das Rollen und die Adhärenz (Nourshargh et al. 1995).

In den eigenen Untersuchungen hatte die Blockade des PAF-Rezeptors mit dem Antagonisten WEB 2170 in einer Menge von 2 mg/kg keinen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelinteraktion. Hingegen hemmte die Verabreichung von 20 mg/kg WEB 2170 signifikant die feste Adhärenz von Leukozyten am Endothel. Als Trend war weiter zu beobachten, dass das Leukozytenrollen ebenfalls inhibiert wurde, dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant war. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass erst mit der Gabe von WEB 2170 in Hochdosis eine ausreichende Konzentration des Antagonisten im Gehirn erreicht wurde. Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse erstmals darauf hin, dass PAF im Modell der globalen zerebralen Ischämie beim Gerbil eine wichtige Rolle bei der Förderung der festen Leukozytenadhärenz spielt. Die Adhärenz wird allerdings nicht vollständig blockiert, was deutlich macht, dass die Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel nicht allein durch PAF, sondern redundant auch durch weitere Stoffe ausgelöst wird. Die Wirkung auf das Leukozytenrollen ist weniger ausgeprägt. Allerdings zeigt der Trend zur Verminderung des Leukozytenrollens, dass PAF nicht nur eine Wirkung auf die feste Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel hat, sondern auch am Rollen von Leukozyten beteiligt ist.

4.5.5 Funktionelle Kapillardichte

In der Versuchsreihe, in der der PAF-Antagonist in Hochdosis verabreicht wurde, war die funktionelle Kapillardichte während der gesamten Reperfusionphase sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe im Vergleich zum jeweiligen Ausgangspunkt

signifikant vermindert. Der Abfall der funktionellen Kapillardichte war dabei in beiden Gruppen gering und betrug um 10-15 %. Es lag kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Therapiegruppe vor. Dies macht deutlich, dass PAF in der frühen Reperfusionphase keinen Einfluss auf die funktionelle Kapillardichte hat. Die Werte der funktionellen Kapillardichte während der Ischämie lagen bei etwa fünf % des Ausgangswertes, was für eine ausgeprägte Ischämie in diesem Modell spricht.

Auch wenn die Reduktion der funktionellen Kapillardichte in den beiden Gruppen signifikant war, muss stark daran gezweifelt werden, dass diese Reduktion im Sinne des "no-reflow"-Phänomens an der Ausbildung des sekundären Hirnschaden beteiligt ist. Eine positive Korrelation zwischen funktioneller Kapillardichte und Ausmaß des Nervenzellschadens war nicht vorhanden.

4.5.6 Mikrovaskuläre Durchblutung

Unter physiologischen Bedingungen beeinflusst PAF die zerebrale Durchblutung nicht (Kochanek et al. 1990). Dieses Ergebnis wird durch unsere Experimente bestätigt. Während der Stabilisierungsphase vor der Ischämie wurde die mikrovaskuläre Durchblutung vor und nach der Gabe von WEB 2170 gemessen. Es fand sich kein Unterschied der Werte für den untersuchten Zeitraum.

Anders scheint die Situation nach einer globalen zerebralen Ischämie zu sein. 90 Minuten nach einer globalen Ischämie von zehn Minuten Dauer war die Durchblutung durch die Gabe des PAF-Antagonisten BN 52021 mit Beginn der Reperfusion erhöht (Panetta et al. 1987). Bereits weiter oben wurde die Studie von Kochanek et al. erwähnt, die gezeigt hat, dass die intraarterielle Infusion von PAF zur zerebralen Hypoperfusion führt (Kochanek et al. 1988). Faden und Halt injizierten PAF intrathekal und beobachteten, dass dadurch die Durchblutung des Rückenmarks reduziert wurde (Faden und Halt 1992). Die Antagonisierung von PAF sowohl nach einer zerebralen Ischämie bei Ratten als auch nach einer spinalen Ischämie bei Kaninchen mit dem PAF-Antagonisten BN 50739 verringerte

die Ausbildung der postischämischen Hypoperfusion (Frerichs et al. 1990b, Lindsberg et al. 1990).

Die Applikation des Antagonisten WEB 2170 in der Niedrig- wie auch der Hochdosis hatte bei unseren Versuchen keinen Einfluss auf die postischämische mikrovaskuläre Durchblutung, die Hypoperfusion war in der Kontroll- wie auch in der Therapiegruppe gleichermaßen ausgebildet. Dieses Ergebnis widerspricht damit den zitierten Arbeiten. Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen Methoden der Durchblutungsmessung, die unterschiedlichen verwendeten Antagonisten und die verschiedenen untersuchten Spezies sein.

4.5.7 Neurologisches Defizit und Überleben

Spinnewyn und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von PAF-Antagonisierung auf das neurologische Defizit nach einer zerebralen Ischämie. Die Therapie mit dem Antagonisten BN 52021 verringerte die Morbidität (stroke index) von Gerbils während der Reperfusionphase von sechs Stunden Dauer (Spinnewyn et al. 1987). Kritisch ist bei dieser Studie die sehr kurze Überlebenszeit von nur sechs Stunden zu beurteilen. Einen weiteren Hinweis auf die Auswirkungen von PAF auf die neurologische Funktion gibt die bereits zitierte Arbeit von Faden und Halt. Sie beobachteten dosisabhängig nach intrathekaler Applikation von PAF stark reduzierte motorische und neurologische Fähigkeiten bei Ratten (Faden und Halt 1992).

Die Gabe von WEB 2170 in der Dosis von 2 mg/kg hatte keinen Einfluss auf das neurologische Defizit und das Überleben der Wüstenrennmäuse. Die Therapie mit 20 mg/kg WEB 2170 hatte keinen Einfluss auf das Überleben, hingegen war das neurologische Defizit bei den Tieren der Therapiegruppe ausgeprägter als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse widersprechen damit der oben zitierten Arbeit. Es wäre daher von großem Wert, dass diese Untersuchungen evtl. an einem anderen Modell mit einer anderen Tierspezies mit größeren Tierzahlen wiederholt werden, um die

Wirkung von PAF-Antagonisten nach einer globalen zerebralen Ischämie besser beurteilen zu können.

4.5.8 Histomorphometrie

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Antagonisierung von PAF nach einer zerebralen Ischämie den Hirnschaden vermindern kann. Die Gabe des Antagonisten Ginkolid B bei einer zehnminütigen globalen Ischämie bei Ratten konnte den Nervenzellschaden im Hippocampus, gemessen sieben Tage nach der Ischämie, vermindern (Oberpichler et al. 1990). Auch die Antagonisten BN 52020 and BN 52021 reduzierten den Nervenzellschaden nach einer globalen zerebralen Ischämie bei Ratten (Pregn et al. 1993). In der gleichen Arbeit wurde auch der durch Glutamat vermittelte Schaden auf Nervenzellen von Hühnerembryonen untersucht. Der Zusatz der zuvor genannten Antagonisten zum Kulturmedium schützte die Neurone vor der Exitotoxizität. In einer anderen Studie wurde die Wirkung von PAF-Antagonisierung auf die Parenchymnekrose nach einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie bei Ratten untersucht. Die Therapie mit dem Antagonisten Apafant reduzierte die ischämische Nekrose (Bielenberg et al. 1992)

Als ursächlich für die neuroprotektive Wirkung von PAF-Antagonisten kommen mehrere Mechanismen in Frage. Es wurde bereits auf die Aufhebung der postischämischen Hypoperfusion eingegangen, die von Frerichs et al. und Lindsberg et al. beschrieben wurde (Frerichs et al. 1990b, Lindsberg et al. 1990). Dieser Mechanismus scheint bei unseren Versuchen ohne Bedeutung zu sei, da auch nach der Blockade des PAF-Rezeptors eine postischämische Hypoperfusion vorlag. PAF führt zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Ca^{++} , was zum Zelltod beitragen kann (Domanska-Janik und Zablocka 1995, Bazan et al. 1991). Es wird auch für möglich gehalten, dass PAF direkt die Produktion von freien Radikalen stimulieren und somit neurotoxisch wirken kann (Powell 1992). Kintner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Gabe eines PAF-Antagonisten die Membran von Mitochondrien während einer zerebralen Ischämie, und damit das Neuron,

schützt (Kintner et al. 1997). Als weiterer Mechanismus könnte die Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität sein, die durch PAF verursacht wird und einen Zusammenbruch der Ionenhomöostase zur Folge haben kann (Catalan et al. 1994). Als der vermutlich wichtigste Faktor muss weiterhin die Rolle von PAF als proinflammatorischer Mediator angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein neuroprotektiver Effekt nach Gabe des PAF Antagonisten beobachtet werden. Auch hier widersprechen die Experimente den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen. Die von uns angewendeten relativ harten Kriterien der histomorphologischen Bewertung in unterschiedlichsten Hirnarealen lassen wenig Zweifel an den Ergebnissen aufkommen. Als Grund für den therapeutischen Misserfolg könnte allerdings der Applikationsmodus des Antagonisten genannt werden. Der Antagonist WEB 2170 wurde in der vorliegenden Arbeit 15 Minuten vor der Induktion der Ischämie in einem einmaligen Bolus von 2 mg/kg KG und 20 mg/kg KG i.v. injiziert. Bei einer Halbwertszeit von zwei bis zwölf Stunden ist die Wirkung des Antagonisten kurz. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Dosis zu gering war, um die Ausbildung des Nervenzellschadens zu vermindern. Diese Hypothese wird durch zwei weitere Veröffentlichungen unterstützt. Ma et al. setzten den Antagonisten in einem myokardialen Ischämie/Reperusionsmodell bei Katzen ein. WEB 2170 (1 mg/kg als Bolus plus 2 mg/kg/h) verringerte das nekrotische Areal sowie die Plasmaspiegel der Kreatininkinase (Ma et al. 1992). Hingegen konnten die Autoren den, das Myokard schützenden Effekt bei der Gabe des Antagonisten bei alleiniger Bolusgabe nicht beobachten. Watson und Mitarbeiter verabreichten WEB 2170 in einer Dosis von 13 mg/kg/d als Zusatztherapie zusammen mit Cyclosporin A bei Hunden nach einer Nierentransplantation. Die Zusatztherapie verzögerte signifikant die Abstoßungsreaktion des Transplantats (Watson et al. 1993). In den beiden Veröffentlichungen wurde der Antagonist in höherer Dosis als in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von WEB 2170 auch in höherer Dosierung in einem primär auf diesen Zielparameter ausgerichteten Modell erscheint daher sinnvoll, vielversprechend und notwendig.

4.6 Bradykinin

Das Ergebnis, dass die Infusion von Bradykinin bei Gerbils eine Senkung des arteriellen Blutdrucks verursacht, lässt den Schluss zu, dass auch Gerbils über ein Kallikrein-Kinin-System verfügen. Es kann aber keine Aussage darüber gemacht werden, ob alle Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems in vergleichbarer Menge, Verteilung oder Lokalisation wie beim Menschen, Primaten oder Nagern vorhanden sind.

4.6.1 Bradykinin im zentralen Nervensystem

Unter physiologischen Bedingungen wird Bradykinin, das aktive Nonapeptid des Kallikrein- Kinin-Systems, im Hirnparenchym in kleinen Mengen generiert und freigesetzt. Die verschiedenen Komponenten des Kallikrein-Kinin-System, wie das Kallikrein, das aus Kininogen Kallidin freisetzt, sind in mehreren Spezies gefunden worden (Kariya et al. 1984, Kizuki et al. 1994a, Kizuki et al. 1994b, Raidoo et al. 1996,

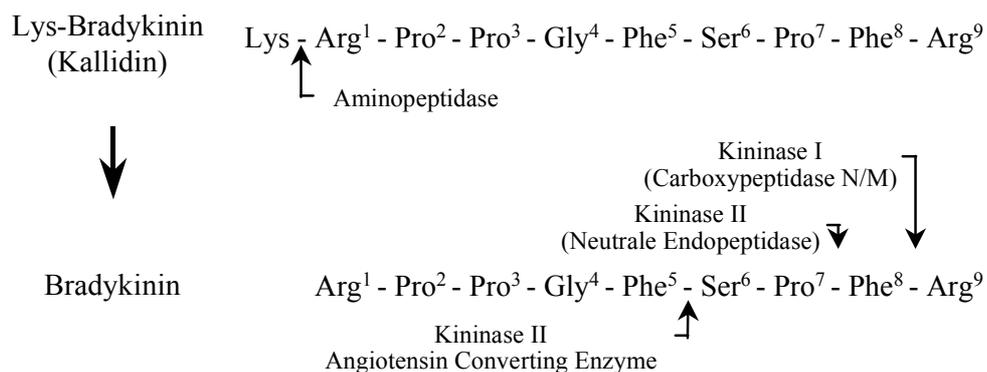


Abbildung 47: Entstehung von Bradykinin und dessen Abbau. Die Aminopeptidase spaltet aus Kallidin Lysin ab, so dass Bradykinin freigesetzt wird (Zeile 1). Inaktiviert wird Bradykinin nach Spaltung des Nonapeptids mit Kininasen I und II an den angegebenen Stellen (Zeile 2). Modifiziert nach Regoli und Barabe 1980.

Simson et al. 1986). In Säugetieren sind zwei bestimmende biochemische Kaskaden, die Bradykinin produzieren, bekannt. Die Bindung des inaktiven Hageman Faktors im Plasma an negative Oberflächen wie geschädigte Basalmembranen oder Endothelzellen aktiviert den Hageman Faktor, der Plasmakallikrein von Präkallikrein abspalten kann. Plasmakallikrein liberiert dann BK aus dem hochmolekularen Kininogen im Plasma. In Geweben liberiert Gewebekallikrein, das aus aktiviertem Gewebepräkallikrein freigesetzt wurde, das Decapeptid Lys-BK aus niedermolekularem Kininogen. Bradykinin kommt gehäuft im Hypothalamus und im Kortex vor (Perry et al. 1984). Auch die verschiedenen Kininasen konnten im Hirngewebe nachgewiesen werden (Correa et al. 1990, Correa et al. 1986, DelBel et al. 1989, Hori et al. 1971, Kariya et al. 1981, Oliveira et al. 1976). Wichtig scheint dabei der Metabolismus von Bradykinin zu des-Arg⁹-Bradykinin zu sein, da das freigesetzte L-Arginin Substrat für die NO-Synthetase ist und auf diesem Weg vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) entsteht (Bhoola et al. 1992). Des-Arg-Bradykinin selbst ist aber auch aktiver Metabolit im Kallikrein-Kinin-System da das Peptid an einen der zwei Bradykininrezeptor-Subtypen (B1-Rezeptor) bindet.

Die beiden Bradykininrezeptoren B1 und B2 werden anhand ihrer unterschiedlichen Affinität zu Agonisten und Antagonisten charakterisiert. Die Stärke der Affinität zu den Agonisten wurde wie folgt von Regoli & Barabé beschrieben: Methionyl-Lysyl-Bradykinin (M-L-BK) > des-Arg⁹-Bradykinin > Bradykinin für B1-Rezeptoren und Bradykinin > M-L-Bradykinin > des-Arg⁹-Bradykinin für B2-Rezeptoren. Bei den Bradykininrezeptoren handelt es sich um "seven membran spanning"-Rezeptoren, bei denen die Bindung des Agonisten ein G-Protein aktiviert. Dies ruft die Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen, die Mobilisierung von Ca⁺⁺ sowie die Aktivierung der Phosphokinase C hervor (Bhoola et al. 1992, Regoli und Barabé 1980, Wiemer et al. 1994). Rezeptor-Bindungsstudien zeigten die Präsenz von B2-Rezeptoren in verschiedenen Spezies wie Meerschweinchen, Ratten und Hunden (Lopes et al. 1995, Lopes et al. 1993, Manning et al. 1989, Privitera 1992). Die Expression von B2-Rezeptoren im Gehirn scheint konstitutiv und ubiquitär zu sein und konnte auf Neuronen, Astrozyten und in zirkumventrikulären Organen beobachtet werden (Chen et al. 2000, Cholewinski et al. 1991, Raidoo et al.

1996). Der Nachweis von B1-Rezeptoren im Gehirn gelang erst in wenigen Fällen. B1-Rezeptoren konnten paraventriculär im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden, scheinen ansonsten aber nur unter pathophysiologischen Bedingungen vorzuliegen, d.h. induzierbar zu sein (Emanuelli et al. 1999). Die Stimulation von humanen zerebralen Endothelzellen mit Interferon führt zur Steigerung der B1-Rezeptorexpression (Prat et al. 2000). B1-Rezeptoren konnten jedoch auch auf humanen Neuronen des Hypothalamus, Nucleus caudatus, der Substantia gelatinosa und des Rückenmarks nachgewiesen werden (Bhoola 1996). Der Autor berichtet jedoch nicht darüber, an welcher Erkrankung die Patienten verstorben waren, von denen die Proben gewonnen wurden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen Patienten eine Ischämie oder andere Erkrankung des ZNS vorlag.

Gesteigerte Konzentrationen an Kininogen und Kinin in interstitieller Flüssigkeit wurden im Spinalmark nach einer traumatischer Kälteläsion und im Gehirn nach Fluid percussion

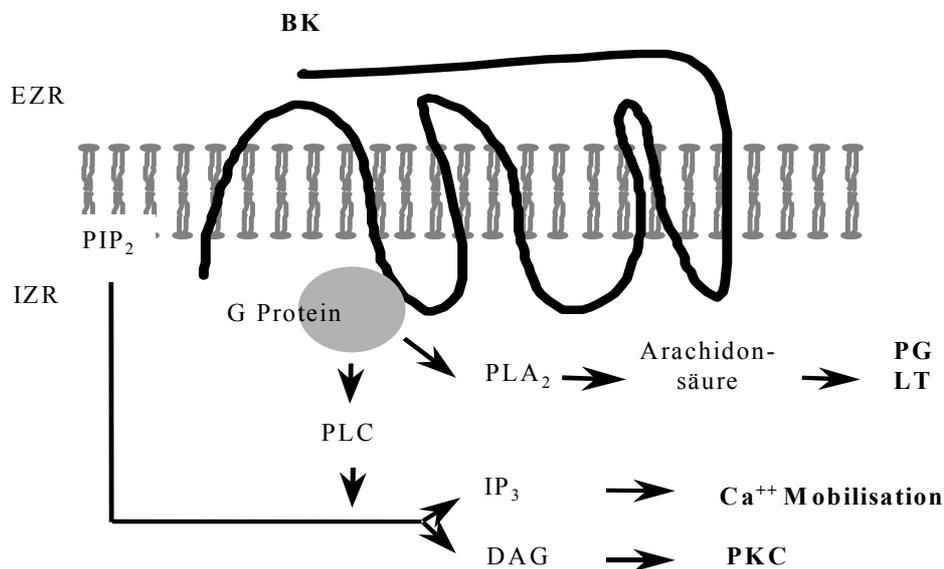


Abbildung 48: Bindung des Agonisten an den B1- oder B2-Rezeptor führt zur Bildung von Prostaglandin und Leukotrienen, zur Mobilisierung von Ca⁺⁺ und zur Aktivierung der Phosphokinase C (PKC). EZR: Extrazellulärraum, IZR: Intrazellulärraum, PLC: Phospholipase C, PIP₂: Phosphoinositolbiphosphat, IP₃: Inositoltriphosphat, DAG: Diacylglycerin, PLA₂: Phospholipase A₂.

injury beschrieben (Ellis et al. 1989, Xu et al. 1991). Stark erhöhte Plasma- und Gewebekonzentrationen von Bradykinin konnten nach der dreistündigen Okklusion beider Aa. carotides bei der Ratte beobachtet werden (Kamiya et al. 1993). Nach einer fokalen zerebralen Ischämie lagen erhöhte Werte von Kininogen bei der Ratte vor (Chao et al. 1987). Bereits eingangs wurde eine Arbeit zitiert, in der die Autoren einen erhöhten Kininogenverbrauch beim Schlaganfall beim Menschen beschrieben (Makevnina et al. 1994). Beim Modell der traumatischen Kälteläsion bewirkt Bradykinin eine Vasodilatation und gesteigerte Vasopermeabilität und somit die Ausbildung des vasogenen Hirnödems (Maier-Hauff et al. 1984).

4.6.2 Gefäßdurchmesser

Erste Studien an Gefäßen von Kaninchen führten zur Entdeckung zweier Kininrezeptoren, B1 und B2. Die Erregung des B1-Rezeptors hat eine Kontraktion der Kaninchenaorta und des B2- Rezeptors der Jugularvene zur Folge (Gaudreau et al. 1981, Regoli et al. 1977). Experimente an Nierengefäßen von Hunden wiesen B2-Rezeptoren auf arteriellen Endothelzellen und glatten Muskelzellen nach, die via Freisetzung von NO (Endothelzelle) und Prostaglandinen (glatte Muskelzelle) entspannend auf die Gefäße einwirkten (Rhaleb et al. 1989). Die Bindung an B1-Rezeptoren auf glatter Gefäßmuskulatur hat über die Freisetzung von Prostaglandinen ebenfalls die Dilatation von Nierengefäßen zur Folge. Die durch Kinine hervorgerufenen Reaktionen unterscheiden sich je nach untersuchter Spezies. Bei Untersuchungen an humanen Umbilikalvenen konnte beobachtet werden, dass sowohl die Reizung von B1- wie auch B2-Rezeptoren von einer Kontraktion gefolgt ist. Diese Kontraktion scheint durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration vermittelt zu sein (Regoli et al. 1996).

Bekannte Wirkungen von Bradykinin auf zerebrale Gefäße sind zum einen die Beeinflussung der Vasomotorik und die Steigerung der Blut-Hirnschrankenpermeabilität. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Bradykinin zur Relaxation der A. cerebri media von Katzen (Whalley et al. 1983), der A. basilaris von Kaninchen (Whalley et al. 1983) und

von humanen Aa. basillares (Whalley et al. 1987) durch die Bindung an den B2-Rezeptor führt. Die Kontraktion der A. basilaris von Kaninchen wurde erst nach mehrmaliger intermittierender Gabe von Bradykinin über zehn Stunden beobachtet, wobei diese Antwort durch die zusätzliche Applikation von Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, gehemmt werden konnte. Daraus ist zu schließen, dass B1-Rezeptoren *de novo* generiert werden und nicht ständig auf Zellenmembranen von zerebralen Gefäßen präsent sind (Whalley et al. 1983). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur die perivasale Mikroapplikation oder Superfusion des Kortex von Bradykinin und nicht die Infusion in die A. carotis zur Kontraktion von Arterien führte (Unterberg et al. 1984b, Whalley et al. 1983). Die Autoren postulierten, dass B2-Rezeptoren nicht auf dem Endothel, sondern auf der glatten Gefäßmuskulatur präsent sind (Unterberg et al. 1984b). In einer weiteren Studie konnten Unterberg und Mitarbeiter zeigen, dass das Austreten von Na⁺-Fluoreszein in das Hirnparenchym durch die intra- und extravasale Applikation von Bradykinin über den B2-Rezeptor induziert wurde (Unterberg et al. 1984b). Dies lässt vermuten, dass die Bindung von Bradykinin an den B2-Rezeptor von Endothelzellen Störungen der Blut-Hirnschranke bewirkt, allerdings keinen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur hat. Die Bindung von Bradykinin an den B2-Rezeptor der glatten Muskelzelle hat eine dilatative Wirkung. Die Dilatation scheint dabei sekundär über die Bildung von freien Radikalen und Prostaglandinen verursacht zu sein (Holland et al. 1990, Kontos et al. 1984). Auch nach einer Subarachnoidalblutung wirkt Bradykinin vasodilatierend (Katusic et al. 1993). Die Anzahl von Untersuchungen zum Pathomechanismus des Bradykinins bei Erkrankungen des Gehirns sind derzeit relativ gering, eine abschließende Beurteilung ist noch nicht möglich.

Bei den eigenen Untersuchungen hatte die Injektion der Bradykinin-Rezeptorantagonisten keinen Einfluss auf den arteriolen Gefäßdurchmesser in Ruhe unter Kontrollbedingungen. Das bedeutet, dass Bradykinin unter physiologischen Bedingungen nicht an der Kontrolle der zerebralen Vasomotorik beteiligt ist. Es ergaben sich nur geringfügige Kaliberänderungen während der Reperfusionphase in der Kontroll-, der B1- und der B1/B2-Antagonistengruppe. Nach Gabe des B2-Antagonisten wurde hingegen

eine signifikante Verringerung der arteriölen Durchmesser in der frühen Reperfusionphase bis zwei Stunden nach Ende der Ischämie beobachtet. 40 Minuten nach Beginn der Reperfusion lag dabei eine Durchmesser verringering um 27 % im Vergleich zum Zeitpunkt fünf Minuten vor dem Ischämiebeginn vor. Diese Ergebnisse können so gedeutet werden, dass Bradykinin in der Reperfusionphase nach der globalen zerebralen Ischämie liberiert wird und über die Bindung an B2-Rezeptoren für eine Gefäßrelaxation sorgt. Wird dieser Mechanismus geblockt, so resultiert dies in einer Vasokonstriktion. Der B2-Rezeptorantagonist CP 0597 ist, wie bereits weiter oben beschrieben, ein Peptidantagonist und sollte daher, eine intakte Blut-Hirnschranke vorausgesetzt, nicht über die Endothelbarriere hinweg ins Hirnparenchym austreten können. Aus unseren Ergebnissen folgernd kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Bindung von Bradykinin an B2-Rezeptoren der luminalen Endothelmembran zu einer Vasodilatation nach der globalen zerebralen Ischämie führt. Unsere Ergebnisse widersprechen damit den oben zitierten Experimenten von Unterberg und Mitarbeiter, die nachgewiesen hatten, dass B2-Rezeptoren nur auf der Gefäßmuskulatur lokalisiert sind und nicht auf dem Gefäßendothel (Unterberg et al. 1984b). Diese Ergebnisse wurden allerdings aus Experimenten an gesunden Tieren gewonnen. Es ist bekannt, dass die Präsenz und Funktionalität von Bradykininrezeptoren starken Änderungen unterworfen sind. Windischhofer und Mitarbeiter beobachteten an einer Osteoblasten-Zelllinie, dass nach Exposition der Zellen mit Bradykinin die B2-Rezeptoren internalisiert werden und erst nach gewisser Zeit teilweise wieder auf der Membran nachweisbar sind (Windischhofer et al. 1997). Nach einer zerebralen Ischämie könnte eine veränderte Anzahl und Bindungskapazität der Rezeptoren am zerebralen Endothel vorliegen. Dies könnte als eine Erklärung für die von uns beobachtete Vasokonstriktion nach Gabe des B2-Antagonisten dienen. Widersprüchlich sind die Ergebnisse, dass auf der einen Seite der B2-Antagonist eine Vasokonstriktion bewirkt, hingegen der kombinierte B1/B2-Antagonist keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser hat. Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse kann derzeit nicht angeboten werden.

4.6.3 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Bradykinin wird als einer der wichtigsten initialen Entzündungsmediatoren beschrieben. Das Nonapeptid induziert als Kardinalsmerkmale einer akuten Entzündung die Dilatation von Arterien und die Konstriktion von Venen sowie die Bildung eines Ödems. Im Gehirn wurde die durch Bradykinin induzierte Prostaglandinsynthese für eine durch freie Radikale medierte gesteigerte Vasopermeabilität verantwortlich gemacht. Diese wiederum führt zu einem gesteigerten Wassergehalt von grauer und weißer Substanz (Unterberg et al. 1984a). Bradykinin selbst hat eine sehr kurze Halbwertszeit von etwa 30 Sekunden (Kariya et al. 1982). Dies könnte der Grund dafür sein, dass Bradykinin Stimulator zahlreicher anderer Mediatoren ist, die eine längere Halbwertszeit haben, da das Kallikrein/Kinin-System schnell verbraucht wäre. Diese sekundären Mediatoren sind unter anderen Substanz P,

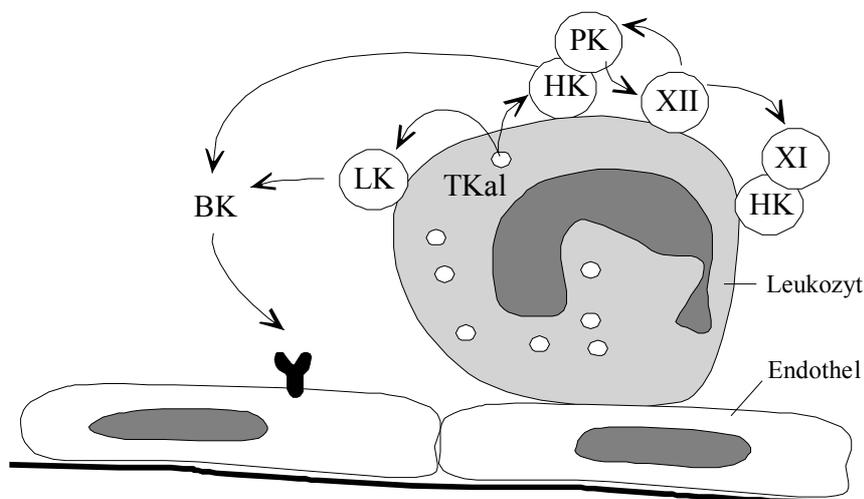


Abbildung 49: Alle wichtigen Substanzen der Kallikrein/Kinin Kaskade liegen direkt gebunden auf neutrophilen Granulozyten vor. Aktivierter Hagemann Faktor (XII) katalysiert die Freisetzung von Kallikrein aus Präkallikrein (PK). Kallikrein ist das Enzym, das die Reaktion von high molecular weight kininogen (HK) zu Bradykinin (BK) ermöglicht. Tissue Kallikrein (TKal) kann Bradykinin sowohl aus low molecular weight kininogen (LK) als auch HK freisetzen. Via Aktivierung des Faktors XI ist ebenfalls die Katalyse von HK zu Kininen möglich. Bradykinin kann an B2-Rezeptoren des Endothels binden (aus Henderson et al. 1994).

Prostaglandine und andere Eicosanoide, Histamin, Arachidonsäure, Stickstoffmonoxid und freie Radikale (Bhattacharya et al. 1986, Ishizaka et al. 1985, Kuehl und Ekgan 1980, Wiemer et al. 1994). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Bradykinin kann das Peptid auch nur sehr lokal wirken, denn schon nach kurzen Wegen ist es abgebaut. Sollte also Bradykinin Mediator der Leukozyten-Endothelinteraktion sein, müsste der Mediator und auch sein Rezeptor an den beteiligten Zellen nachgewiesen werden können. Henderson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass alle Faktoren zur Freisetzung von Kinin aus Kininogen gebunden auf der Zellmembran von Leukozyten vorliegen (Henderson et al. 1994). Auf diese Weise kann Bradykinin lokal begrenzt an B2-Rezeptoren des Endothels binden. Wegen der kurzen Halbwertszeit steht dann auch der Metabolit des Bradykinin, des-Arg-Bradykinin, zur Bindung an den B1-Rezeptor, wenn dieser bereits exprimiert werden sollte, zur Verfügung.

Das von der Leukozytenmembran abgespaltene Bradykinin kann aber nicht nur an das Endothel binden, sondern auch Rezeptoren des Leukozyten selbst stimulieren. Leukozyten sind so in der Lage, proinflammatorisch wirksam zu werden. Es wurde die Freisetzung von TNF und Interleukin 1 aus Makrophagen nach der Zugabe von Bradykinin beschrieben. Diese Freisetzung konnte durch die zusätzliche Gabe eines B1-Antagonisten gehemmt werden (Tiffany et al. 1989). Bereits weiter oben wurden Experimente zitiert, bei denen eine gesteigerte Produktion von freien Radikalen nach der Stimulation von Leukozyten mit Bradykinin beobachtet wurde (Bhattacharya et al. 1986). Versucht man nun dem Mediator Bradykinin einen Platz in der Kaskade der Leukozytenmigration zuzuteilen, dann findet sich dieser zwischen der Stufe des Rollens und der Stufe der festen Adhärenz und Bradykinin spielt – wie auch PAF – eine Rolle als Chemoattractant.

Die Analyse der Leukozyten-Endothelinteraktionen ergab, dass alle drei untersuchten Bradykinin-Rezeptorantagonisten einen hemmenden Einfluss auf das Rollen wie auch auf die feste Adhärenz hatten. Das Rollen von Leukozyten am venulären Endothel wurde durch den B1-Antagonisten B9858 um 61 %, den B2-Antagonisten um 72 % und den B1/B2-Antagonisten um 81 % im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind diese Hemmungen signifikant, die einzelnen Rezeptor-

antagonisten unterscheiden sich nicht von einander. Es wurde bereits ausgeführt, dass Bradykinin nach dem derzeitigen Wissensstand eine Rolle als Chemoattractant zukommt, also Bradykinin nur einen Einfluss auf die feste Adhärenz von Leukozyten haben sollte. Da bereits das Rollen gehemmt wurde, scheinen andere Mechanismen durch die Bindung an die Bradykininrezeptoren in Gang gesetzt zu werden, die dann sekundär fördernd auf das Rollen einwirken. Es kommen hier alle bereits oben genannten Mechanismen in Frage, die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen, die Mobilisation von Ca^{++} , die Freisetzung von TNF und IL 1 sowie freien Radikalen. Erst nachdem unsere Versuche abgeschlossen waren, veröffentlichten Tayeh und Mitarbeiter eine Studie, die einen neuen Mechanismus aufzeigt. Die Autoren untersuchten den Einfluss von Bradykinin auf die Expression von P-Selektin *in vitro* an Endothelzellen (HUVEC). Der Zusatz von Bradykinin zum Kulturmedium steigerte die Expression von P-Selektin (Tayeh et al. 1998). Diese Ergebnisse lassen daher die Hypothese zu, dass Bradykinin nach globaler zerebraler Ischämie beim Gerbil freigesetzt wird und die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin induziert und dadurch schon zum ersten Schritt der Leukozyten-Endothelinteraktion beiträgt.

Die von uns beobachtete Hemmung der Leukozyten-Endothelinteraktionen durch Bradykinin-Rezeptorantagonisten widerspricht den Ergebnissen von Shigematsu et al. (Shigematsu et al. 1999a). Die Autoren fanden eine Hemmung der Leukozyten-Endothelinteraktion nach Superfusion des postischämischen Mesenteriums der Ratte mit Bradykinin. Diese Ergebnisse verwundern, da die gleichen Autoren zeigen konnte, dass die Superfusion eines ungeschädigten Mesenteriums mit Bradykinin zu einer Verstärkung von Leukozyten-Endothelinteraktion führt (Shigematsu et al. 1999b). Eine Wiederholung der beiden Studien scheint deshalb sinnvoll zu sein.

Die feste Adhärenz von Leukozyten wurde ebenfalls durch die Gabe der Bradykinin-Rezeptorantagonisten signifikant vermindert, wobei der B1-Antagonist B9858 die feste Adhärenz um 62 %, der B2-Antagonist CP 0597 um 89 % und der B1/B2-Antagonist um 80 % zum Zeitpunkt drei Stunden nach Beginn der Reperfusion verringerte. Damit ist nachgewiesen, dass die Bindung von Bradykinin an den B1- und den B2-Rezeptor nicht

nur das Leukozytenrollen sondern auch die feste Adhärenz von Leukozyten am Endothel zerebraler Venolen auslöst. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob die Reduzierung der festen Adhärenz durch die Reduzierung des Leukozytenrollens bedingt ist oder aber die Blockade der Bradykininrezeptoren direkt Mechanismen der festen Adhärenz hemmt.

Diese Ergebnisse bestätigen eine Studie zur Ischämie und Reperfusion des Pankreas der Ratte (Hoffmann et al. 1996). Die Therapie mit zwei unterschiedlichen B2-Rezeptorantagonisten (Hoe 140 und CP 0597) reduzierte signifikant die Anzahl adhärenter Leukozyten an postkapillären Venolen in der frühen Reperfusionphase nach zweistündiger Ischämie.

4.6.4 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte war in der Kontroll- und den drei Therapiegruppen während der frühen Reperfusionphase leicht vermindert, allerdings ist diese Reduzierung zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass nach einer globalen zerebralen Ischämie der Verschluss von Kapillaren eine sehr untergeordnete Rolle spielt und das anfangs erwähnte "no-reflow phenomenon" in diesem Modell nicht nachgewiesen werden kann.

4.6.5 Mikrovaskuläre Durchblutung

Die Untersuchung der arterio-venösen Transitzeit ergab, dass die Hirndurchblutung während der frühen Reperfusionphase in allen Gruppen signifikant vermindert war. Diese Ergebnisse bestätigen die vielfach beschriebene postischämische Hypoperfusion, wobei mit dieser Methode die kurzfristige postischämische Hyperperfusion nicht detektiert werden konnte. Die signifikante Konstriktion von Arteriolen in der mit B2-Antagonisten behandelten Gruppe resultierte nicht in einer verminderten zerebralen Durchblutung. Diese starke Konstriktion der Arteriolen sollte jedoch hämodynamisch wirksam sein und zu einer

Senkung der Durchblutung führen. Weder die funktionelle Kapillardichte, die Durchmesser der Arteriolen und Venolen noch die Leukozyten-Endothelinteraktionen haben einen Einfluss auf das Ausmaß der postischämischen Hypoperfusion. Für die Minderdurchblutung müssen andere, in dem vorliegenden Modell nicht bestimmte Mechanismen verantwortlich sein.

4.6.6 Neurologisches Defizit und Überleben

Weiter oben wurde bereits ausgeführt, dass das Überleben die wohl wichtigste Aussage über das therapeutische Potenzial eines Medikaments bei der globalen zerebralen Ischämie ist. Die Tiere, die den B2-Antagonisten erhielten, hatten die beste Überlebenschance (90 %). Es überlebten 70 % der Tiere der Kontrollgruppe. Die Blockade des B1-Rezeptors führte zum Versterben von 60 % der Tiere. Die kombinierte Blockade des B1- und B2-Rezeptors hob die protektiven Effekte der B2-Rezeptorblockade vollständig auf, und es überlebten nur 30 % der Tiere. Der protektive Effekt des B2-Antagonisten war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant (90 % vs. 70 %). Allerdings war die Überlebensrate der Tiere, die mit B2-Antagonisten behandelt worden waren, signifikant höher, wenn diese mit der Überlebensrate der Tiere, die mit dem B1- und dem B1/B2-Antagonisten behandelt worden waren, verglichen wurde. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Mortalität der Tiere, die den B1/B2-Antagonisten erhalten hatten, signifikant verringert. Diese Ergebnisse lassen hoffen, in größeren Therapiestudien zeigen zu können, dass die selektive Blockade des B2-Rezeptors neuroprotektiv wirkt, die Blockade jedoch spezifisch sein und der B1-Rezeptor unbeeinflusst bleiben muss.

Das Ergebnis der geringsten Überlebensrate bei Blockade des B1-Rezeptors lässt den Rückschluss zu, dass die Aktivierung des B1-Rezeptors in der Reperfusion nach einer globalen zerebralen Ischämie neuroprotektiv wirkt. In den hier beschriebenen Experimenten wurde erstmalig die Rolle von B1-Rezeptoren nach einer zerebralen Ischämie untersucht. Über die möglichen Mechanismen, die durch die Aktivierung von B1-Rezeptoren angestoßen werden, kann daher nur spekuliert werden. Wie bereits

ausgeführt, wurde die Expression von B1-Rezeptoren nicht unter physiologischen, jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen nachgewiesen. Die Bindung des Agonisten an den Rezeptor steuert dann nicht nur die Produktion von Stickstoffmonoxid und Inositoltriphosphat, sondern auch die Produktion verschiedener Cytokine und Wachstumsfaktoren (Morbidelli et al. 1998 und Prat et al. 2000). Bei *in vitro* Untersuchungen an myokardialen Gefäßendothelzellen konnte gezeigt werden, dass nur die selektive Stimulation des B1-Rezeptors einen proliferativen Effekt auf das Wachstum dieser Zellen hatte, hingegen die Stimulation des B2-Rezeptors keinen Effekt hatte (Morbidelli et al. 1998). Die durch die Stimulation des B1-Rezeptors induzierte Angiogenese scheint durch die gesteigerte Expression von fibroblast growth factor-2 (FGF-2) vermittelt zu sein (Parenti et al. 2001). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass Bradykinin eine Rolle bei der Reparatur von Gewebeschäden und der Neuroplastizität haben könnte. Eine Vielzahl von Untersuchungen schreibt verschiedenen Wachstumsfaktoren wie auch dem FGF neuroprotektive Eigenschaften bei der zerebralen Ischämie zu (Fisher et al. 1995 und Marti et al. 2000).

Systemische Nebenwirkungen könnten ebenfalls Ursache der erhöhten Mortalität nach der Blockade des B1-Rezeptors sein. In der Literatur sind keine weiteren Studien beschrieben, in denen die Antagonisten B 9430 und B 9858 über einen längeren Zeitraum *in vivo* verabreicht wurden. Allerdings war die Gabe eines anderen B1-Antagonisten (Lys-[Leu⁸]-des-Arg⁹-BK) über fünf Tage hinweg nicht mit Nebenwirkungen verbunden, systemische Nebenwirkungen als Ursache für die erhöhte Mortalität sind daher unwahrscheinlich (Blais et al. 1997).

Bei allen vier Versuchsgruppen wurde eine signifikante Abnahme des Neuroscores über die vier postischämischen Tage hinweg beobachtet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht erkannt werden. Der Neuroscore ist die Summe verschiedener Einzeluntersuchungen. Ziel der Durchführung der neurologischen Untersuchung war, eine feine graduelle Unterteilung des neurologischen Defizits zu erreichen. Die genaue Betrachtung der Ergebnisse der neurologischen Untersuchungen von jedem einzelnen Tier in dieser Versuchsreihe macht jedoch deutlich, dass diese feine

graduelle Unterteilung nicht möglich war. Vielmehr liegt eher eine Dichotomie vor. Entweder geht es den Tieren gut und sie erreichen einen hohen Neuroscore – oder sie versterben und der Neuroscore beträgt Null. Die Errechnung eines Mittelwerts für jede Gruppe verwischt dieses Ergebnis. Bei der Beurteilung eines funktionellen Defizits sollte daher dem Überleben mehr Bedeutung eingeräumt werden als dem Neuroscore.

4.6.7 Histomorphometrie

Die Ergebnisse der Untersuchung der Zelldichte vitaler Nervenzellen in den verschiedenen Hirnarealen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Therapiegruppen. Dabei muss bedacht werden, dass es sich hierbei um die Untersuchung nur der vier Tage überlebenden Tiere handelt. Es sind also gerade die Gehirne der Tiere, die frühzeitig verstarben, nicht untersucht worden. Den Ergebnissen von Weber et al. zufolge liegt eine positive Korrelation zwischen dem Nervenzellschaden und dem moribunden Zustand der Tiere vor (Weber et al. 1988). Die Autoren unterzogen Gerbils einer globalen zerebralen Ischämie und beobachteten den klinischen Zustand in den Tagen danach. Die Gehirne moribunder Tiere wurden dann für die histologische Auswertung des Nervenzellschadens entnommen und der Nervenzellschaden dieser Tiere dem Nervenzellschaden nicht moribunder Tiere gegenüber gestellt. Es lässt sich daher vermuten, dass auch bei unseren Experimenten die Tiere, die früh verstorben waren, einen ausgedehnten Nervenzellschaden hatten. Dies würde bedeuten, dass der Nervenzellschaden besonders bei den Tieren, die mit dem B1- und dem B1/B2-Antagonisten behandelt wurden, stärker ausgeprägt war.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Störungen der zerebralen Mikrozirkulation insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen nach der globalen zerebralen Ischämie untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Rolle der beiden Mediatoren Platelet-activating factor und Bradykinin bei der Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen aufgeklärt werden. Es sollte dabei auch der Einfluss der Mikrozirkulationsstörungen und der beiden Mediatoren Platelet-activating factor und Bradykinin auf das neurologische Defizit und den ischämischen Hirnschaden berücksichtigt werden. Mit untersucht wurde das therapeutische Potenzial von PAF- und Bradykinin-Rezeptorantagonisten in Hinblick auf die zerebrale Ischämie.

Die globale zerebrale Ischämie mit einer Dauer von 15 Minuten wurde an 153 mongolischen Wüstenrennmäusen (Gerbil) durch Verschluss beider Aa. carotides communes induziert. Vor und bis zu drei Stunden nach der Ischämie wurden Aufnahmen der oberflächlichen kortikalen Mikrozirkulation mit der intravitralen Epifluoreszenzmikroskopie durch ein transdurales Schädelfenster angefertigt. Die Tiere atmeten spontan in Halothan-Maskennarkose, der arterielle Blutdruck wurde kontinuierlich überwacht und die Körpertemperatur mit einer Heizplatte bei 37,0 °C gehalten. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran (MG 150 000) wurden die Gefäße kontrastiert, Rhodamin 6 G diente zur *in vivo* Anfärbung von Leukozyten. Die Analyse der intravitral-mikroskopischen Bilder erfolgte off-line mit einem Computer-unterstützten Bildverarbeitungssystem. Als Parameter wurden die Leukozyten-Endothelinteraktionen, die Durchmesser von Arteriolen und Venolen und die funktionelle Kapillardichte quantitativ beurteilt. Zusätzlich konnte die zerebrale mikrovaskuläre Perfusion durch Messung der arterio-venösen Transitzeit bestimmt werden. Während einer postischämischen Beobachtungszeit von vier Tagen wurde täglich das neurologische Defizit mit und danach histomorphologisch der ischämische Hirnschaden erfasst. Der PAF-Rezeptorantagonist WEB 2170 wurde in zwei verschiedenen Dosierungen, 2 und 20

mg/kg KG, 15 Minuten vor Induktion der Ischämie intravenös injiziert. Der Bradykinin B1-Rezeptorantagonist B 9858, der B2-Rezeptorantagonist CP 0597 und der kombinierte B1/B2-Rezeptorantagonist B 9430 wurden jeweils als Bolus von 18 µg/kg KG 15 Minuten vor der Ischämie i.v. injiziert, gefolgt von einer kontinuierlichen subkutanen Infusion mittels osmotischer Minipumpe in einer Dosierung von 300 ng/kg/min bis zum Ende des Versuchs am Tag vier nach der Ischämie.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können folgende Schlüsse gezogen werden:

Die postischämische Hypoperfusion, die für die Reperfusion nach der globalen zerebralen Ischämie charakteristisch ist, ist weder Folge einer arteriolären Vasokonstriktion noch Folge des Verschlusses von Kapillaren. Nach dem Ende der Okklusion beider Aa. carotides communes ist die Perfusion der kortikalen Kapillaren weitgehend erhalten, das "no-reflow"-Phänomen tritt nach der globalen zerebralen Ischämie mit einer Dauer von 15 Minuten nicht auf.

Das Rollen von Leukozyten wurde durch den PAF-Antagonisten nur tendenziell gehemmt. Die Applikation von WEB 2170 mit einer Dosis von 20 mg/kg KG verminderte selektiv die feste Adhärenz von Leukozyten am venolären Endothel in der frühen Reperusionsphase nach der globalen zerebralen Ischämie. Die Vasomotorik und die zerebrale Durchblutung sind weder unter physiologischen Bedingungen noch während der Reperfusion nach der globalen Ischämie durch den Mediator PAF reguliert. Das neurologische Defizit nach der Therapie mit dem PAF-Antagonisten entspricht dem der Kontrolltiere. Auch der Untergang selektiv vulnerabler Nervenzellen konnte durch die Therapie nicht vermindert werden.

Bradykinin vermittelt sowohl das Rollen als auch die feste Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel. Die selektive Blockade des B1- und des B2-Rezeptors reduzierte die Leukozyten-Endothelinteraktionen im gleichen Ausmaß. Die kombinierte Blockade beider Bradykininrezeptoren hatte keinen zusätzlichen hemmenden Effekt. Bei Antagonisierung des B2-Rezeptors war der Durchmesser pialer Arteriolen während der frühen Reperusionsphase um bis zu 27 % reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass die

Aktivierung des B2-Rezeptors durch Bradykinin nach der globalen Ischämie zur arteriölen Vasodilatation führt. Die Mortalität der Tiere war bei der selektiven Blockade des B1-Rezeptors und bei der kombinierten Blockade beider Rezeptoren signifikant erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des Bradykinin B1-Rezeptors in der Reperfusionphase nach der globalen Ischämie neuroprotektiv wirkt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitgehend unklar, eine Erklärung kann derzeit nicht angeboten werden.

Die Entzündungsreaktion nach der globalen zerebralen Ischämie bei der mongolischen Wüstenrennmaus trägt nicht zur Entwicklung des sekundären Hirnschadens bei, ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Leukozyten-Endothelinteraktionen und dem neurologischen Defizit oder der Überlebensdauer liegt nicht vor. Die Hemmung der postischämischen Entzündungsreaktion nach der globalen zerebralen Ischämie (z.B. nach kardiopulmonaler Reanimation) beim Menschen erscheint daher wenig sinnvoll.

Beide in den Experimenten untersuchten Mediatoren, PAF und Bradykinin, tragen zur Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen bei. Die Antagonisierung beider Mediatoren hat eine teilweise Reduzierung, allerdings nicht eine vollständige Hemmung der Leukozyten-Endothelinteraktionen zur Folge. Weiterführende Untersuchungen an dem von uns verwendeten Modell, z.B. mit der Antagonisierung weiterer Mediatoren (Endothelin, Cytokine) oder der Blockade von Adhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine), sollten die Aufklärung des Wechselspiels der zahlreichen potenziellen Mechanismen der Aktivierung von Leukozyten nach der globalen zerebralen Ischämie möglich machen. Darüber hinaus ist der Vergleich der dargestellten Daten mit Ergebnissen aus Experimenten mit einer fokalen, länger andauernden Ischämie wichtig, um die Kenntnisse über die postischämischen Störungen der Mikrozirkulation erweitern zu können. Erst die vollständige Klärung der komplexen und multifaktoriellen pathophysiologischen Prozesse, die bei der zerebralen Ischämie ablaufen, wird eine effektive Therapie des ischämischen Hirnschadens möglich machen.

6 Literaturliste

ABE, K., YOSHIDA, S., WATSON, B.D., BUSTO, R., KOGURE, K. und GINSBERG, M.D. (1983). alpha-Tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. *Brain Res.* 273, 166-169.

AHLUWALIA, A. und PERRETTI, M. (1996). Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J. Immunol.* 156, 269-274.

AKOPOV, S.E., SERCOMBE, R. und SEYLAZ, J. (1994). Leukocyte-induced acute endothelial dysfunction in middle cerebral artery in rabbits. Response to aggregating platelets. *Stroke* 25, 2246-2252.

ALBERT, D.H. und SNYDER, F. (1983). Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J. Biol. Chem.* 258, 97-102.

AMES, A., WRIGHT, R.L., KOWADA, M., THURSTON, J.M. und MAJNO, G. (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am. J. Pathol.* 52, 437-453.

ARMSTEAD, W.M., POURCYROUS, M., MIRRO, R., LEFFLER, C.W. und BUSIJA, D.W. (1988). Platelet activating factor: a potent constrictor of cerebral arterioles in newborn pigs. *Circ. Res.* 62, 1-7.

ASPEY, B.S., JESSIMER, C., PEREIRA, S. und HARRISON, M.J. (1989). Do leukocytes have a role in the cerebral no-reflow phenomenon? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 52, 526-528.

ASTRUP, J., SIESJO, B.K. und SYMON, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725.

- ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N.M. und LASSEN, N.A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51-57.
- ATHERTON, A. und BORN, G.V. (1973). Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J. Physiol. Lond.* 233, 157-165.
- BAATZ, H., STEINBAUER, M., HARRIS, A.G. und KROMBACH, F. (1995). Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 15, 85-91.
- BACK, T., HOEHN, B.M., KOHNO, K. und HOSSMANN, K.A. (1994). Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. *Stroke* 25, 494-500.
- BAZAN, N.G., SQUINTO, S.P., BRAQUET, P., PANETTA, T. und MARCHESELLI, V.L. (1991). Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids* 26, 1236-1242.
- BECKER, E. (1990). *Fluoreszenzmikroskopie*. 1-72. Wild Leitz Bensheim.
- BEDNAR, M.M., RAYMOND, S., MCAULIFFE, T., LODGE, P.A. und GROSS, C.E. (1991). The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke* 22, 44-50.
- BENVENISTE, J. (1974). Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature* 249, 581-582.
- BENVENISTE, J., HENSON, P.M., and COCHRANE, C.G. (1972). Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136, 1356-1377.

- BHATTACHARYA, S.K., RAO, P.J., BRUMLEVE, S.J. und PARMAR, S.S. (1986). Effects of intracerebroventricular administration of bradykinin on rat brain serotonin and prostaglandins. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 54, 355-366.
- BHOOLA, K.D. (1996). Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors on inflammation. *Immunopharmacology* 33, 247-256.
- BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D. und WORTHY, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44, 1-80.
- BIELENBERG, G.W., WAGENER, G. und BECK, T. (1992). Infarct reduction by the platelet-activating factor antagonist Apafant in rats. *Stroke* 23, 98-103.
- BLAIS, C., COUTURE, R., DRAPEAU, G., COLMAN, R.W. und ADAM, A. (1997). Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum.* 40, 1327-1333.
- BLANK, M.L., LEE, T., FITZGERALD, V. und SNYDER, F. (1981). A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). *J. Biol. Chem.* 256, 175-178.
- BLOCK, F., PERGANDE, G. und SCHWARZ, M. (1997). Flupirtine reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res.* 754: 279-284.
- BLOCK, F. und SCHWARZ, M. (1996). Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 208: 41-44.
- BOARINI, D.J., KASSELL, N.F., COESTER, H.C., BUTLER, M. und SOKOLL, M.D. (1984). Comparison of systemic and cerebrovascular effects of isoflurane and halothane. *Neurosurgery* 15, 400-409.

- BRANSTON, N.M., STRONG, A.J. und SYMON, L. (1977). Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex. *J. Neurol. Sci.* 32, 305-321.
- BRAQUET, P., TOUQUI, L., SHEN, T.Y. und VARGAFTIG, B.B. (1987). Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol. Rev.* 39, 97-145.
- BROWN, A.W. und BRIERLEY, J.B. (1968). The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *Br. J. Exp. Pathol.* 49, 87-106.
- BRUSSEL, T., FITCH, W., BRODNER, G., ARENDT, I. und VAN, A.H. (1991). Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in the baboon. *Anesth. Analg.* 73, 758-764.
- BUBIS, J.J., FUJIMOTO, T., ITO, U., MRSULJA, B.J., SPATZ, M. und KLATZO, I. (1976). Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. V. Ultrastructural changes in H3 sector of the hippocampus. *Acta Neuropathol. Berl.* 36, 285-294.
- BURKARD, M., ZUZACK, J. S., JONES, S., FRANCIS, M., WHALLEY, E. T., STEWART, J. M., and GERA, L. (1996). Comparative profile of novel potent bradykinin antagonists at human B1 and B2 receptors. *Immunopharmacology* 33, 186-190.
- BUSSOLINO, F., GREMO, F., TETTA, C., PESCARMONA, G.P. und CAMUSSI, G. (1986). Production of platelet-activating factor by chick retina. *J. Biol. Chem.* 261, 16502-16508.
- CAMUSSI, G., AGLIETTA, M., CODA, R., BUSSOLINO, F., PIACIBELLO, W. und TETTA, C. (1981). Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology* 42, 191-199.
- CASALS, S.J. und HEUER, H.O. (1990). Use of WEB 2086 and WEB 2170 as platelet-activating factor antagonists. *Methods Enzymol.* 187, 455-465.

- CATALAN, R.E., MARTINEZ, A.M., ARAGONES, M.D., FERNANDEZ, I., MIGUEL, B.G., CALCERRADA, M.C. und PEREZ, M.J. (1994). PAF inhibits (Na,K)ATPase activity in rat brain. *Neurosci. Res.* 19, 241-244.
- CHAO, J., HSU, C.Y., HOGAN, E.L., LUK, Y.O. und CHAO, L. (1987). Increased Kininogen content in focal cerebral ischemia. *Stroke* 18, 290.
- CHAO, W. und OLSON, M.S. (1993). Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292, 617-629.
- CHEN, E.Y.; EMERICH, D.F., BARTUS, R.T., KORDOWER, J.H. (2000). B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 427, 1-18.
- CHEN, H., CHOPP, M., ZHANG, R.L., BODZIN, G., CHEN, Q., RUSCHE, J.R. und TODD, R.F. (1994). Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. *Ann. Neurol.* 35, 458-463.
- CHIANG, J., KOWADA, M., AMES, A., WRIGHT, R.L. und MAJNO, G. (1968). Cerebral ischemia. Vascular changes. *Am. J. Pathol.* 52, 455-476.
- CHOLEWINSKI, A.J., STEVENS, G., MCDERMOTT, A.M. und WILKN, G.P. (1991). Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 57, 1456-1458.
- CHOPP, M., ZHANG, R.L., CHEN, H., LI, Y., JIANG, N. und RUSCHE, J.R. (1994). Posts ischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25, 869-875.
- CHOPP, M., ZHANG, R.L. und JIANG, N. (1996). The role of adhesion molecules in reducing cerebral ischemic cell damage. *Adv. Neurol.* 71, 315-326.
- CLARK, W.M., MADDEN, K.P., ROTHLEIN, R. und ZIVIN, J.A. (1991). Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. *J. Neurosurg.* 75, 623-627.

- CORREA, F.M., GUILHAUME, S.S. und SAAVEDRA, J.M. (1990). Autoradiography of angiotensin-converting enzyme in fixed and unfixed rat brain using the specific enzyme inhibitor [125I]351A or a polyclonal antibody and [125I]staphylococcal protein A. *Neurosci. Lett.* 110, 244-248.
- CORREA, F.M., PLUNKETT, L.M. und SAAVEDRA, J.M. (1986). Quantitative distribution of angiotensin-converting enzyme (kininase II) in discrete areas of the rat brain by autoradiography with computerized microdensitometry. *Brain Res.* 375, 259-266.
- COX, D. R. (1972). Regression models and life tables. *J. Royal Stat. Soc.* 34, 187-220.
- CRAIN, B.J., WESTERKAM, W.D., HARRISON, A.H. und NADLER, J.V. (1988). Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 27(2), 387-402.
- DE LA TORRE, J.C., FORTIN, T., SAUNDERS, J.K., BUTLER, K. und RICHARD, M.T. (1992). The no-reflow phenomenon is a post-mortem artifact. *Acta Neurochir. Wien.* 115, 37-42.
- DEL ZOPPO, G.J. (1994) Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 6:47-96.
- DEL ZOPPO, G.J., WAGNER, S. und TAGAYA, M. (1997). Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute stroke. *Drugs* 54:9-38.
- DELBEL, E.A., PADOVAN, A.P., PADOVAN, G.J., SELLINGER, O.Z. und MARTINS, A.R. (1989). Enzymatic inactivation of bradykinin by rat brain neuronal perikarya. *Cell Mol. Neurobiol.* 9, 379-400.
- DIRNAGL, U., NIWA, K., SIXT, G. und VILLRINGER, A. (1994). Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 25, 1028-1038.

- DOMANSKA-JANIK, K. und ZABLOCKA, B. (1995). Modulation of signal transduction on rat synaptoneuroosomes by platelet-activating factor. *Mol. Chem. Neuropathol.* 25, 51-67.
- DOMINGO, M.T., SPINNEWYN, B., CHABRIER, P.E. und BRAQUET, P. (1988). Presence of specific binding sites for platelet-activating factor (PAF) in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 730-736.
- DOMINGO, M.T., SPINNEWYN, B., CHABRIER, P.E. und BRAQUET, P. (1994). Changes in [³H]PAF binding and PAF concentrations in gerbil brain after bilateral common carotid artery occlusion: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* 640, 268-276.
- DOROVINI ZIS, K., BOWMAN, P.D. und PRAMEYA, R. (1992). Adhesion and migration of human polymorphonuclear leukocytes across cultured bovine brain microvessel endothelial cells. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 51, 194-205.
- DURAN, W.N. und DILLON, P.K. (1990). Acute microcirculatory effects of platelet-activating factor. *J. Lipid Mediat.* 2 Suppl, S215-27.
- DUTKA, A.J., KOCHANEK, P.M. und HALLENBECK, J.M. (1989). Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 20, 390-395.
- EDWARDS, R.M., TRIZNA, W. und FEUERSTEIN, G. (1991). Platelet-activating factor (PAF) has no direct effect on rat intracerebral arterioles in vitro. *J. Lipid Mediat.* 3, 161-165.
- EKE, A., CONGER, K.A., ANDERSON, M. und GARCIA, J.H. (1990). Histologic assessment of neurons in rat models of cerebral ischemia. *Stroke* 21, 299-304.
- ELLIS, E.F., CHAO, J. und HEIZER, M.L. (1989). Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J. Neurosurg.* 71, 437-442.

ELLIS, E.F., WEI, E.P., COCKRELL, C.S., CHOI, S. und KONTOS, H.A. (1983). The effect of PGF₂ alpha on in vivo cerebral arteriolar diameter in cats and rats. *Prostaglandins* 26, 917-923.

FADEN, A.L. und HALT, P. (1992). Platelet-activating factor reduces spinal cord blood flow and causes behavioral deficits after intrathecal administration in rats through a specific receptor mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1064-1070.

FARR, R.S., COX, C.P., WARDLOW, M.L. und JORGENSEN, R. (1980). Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15, 318-330.

FEUERSTEIN, G.Z., WANG, X. und BARONE, F.C. (1998). The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5: 143-159.

FEUERSTEIN, G.Z., LUI, T. und BARONE, F.C. (1994). Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor α . *Cerebrov. Brain Metab. Rev.* 6:341-360.

FISCHER, E.G., AMES, A., HEDLEY WHYTE, E.T. und O'GORMAN, S. (1977). Reassessment of cerebral capillary changes in acute global ischemia and their relationship to the "no-reflow phenomenon". *Stroke* 8, 36-39.

FISHER, M., MEADOWS, M.E., DO, T., WEISE, J., TRUBETSOY, V., CHARETTE, M. und FINKLESTEIN, S.P. (1995) Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, 953-959.

FRANCESCANGELI, E., DOMANSKA, J.K. und GORACCI, G. (1996a). Relative contribution of the de novo and remodelling pathways to the synthesis of platelet-activating factor in brain areas and during ischemia. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 14, 89-98.

- FRANCESCANGELI, E., FREYSZ, L. und GORACCI, G. (1996b). PAF-synthesizing enzymes in neural cells during differentiation and in gerbil brain during ischemia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416, 21-27.
- FRANCESCANGELI, E. und GORACCI, G. (1989). The de novo biosynthesis of platelet-activating factor in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 107-112.
- FRERICHS, K.U. und FEUERSTEIN, G.Z. (1990a). Platelet-activating factor-key mediator in neuroinjury? *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 2, 148-160.
- FRERICHS, K.U., LINDSBERG, P.J., HALLENBECK, J.M. und FEUERSTEIN, G.Z. (1990b). Platelet-activating factor and progressive brain damage following focal brain injury. *J. Neurosurg.* 73, 223-233.
- GAEHTGENS, P. (1991). Heterogeneity of capillary perfusion. *Blood Vessels* 28, 197-200.
- GAEHTGENS, P., LEY, K., PRIES, A.R. und MUELLER, R. (1985) Mutual interaction between leukocytes and microvascular blood flow. *Prog. Appl. Microcirc.* 7, 15-28.
- GARCIA, J.H., LIU, K.F., YOSHIDA, Y., LIAN, J., CHEN, S. und DEL ZOPPO, G.J. (1994). Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am. J. Pathol.* 144, 188-199.
- GARCIA, J.H., WAGNER, S., LIU, K.F. und HU, X. (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 26, 627-635.
- GAUDREAU, P., BARABE, J., ST-PIERRE, S. und REGOLI, D. (1981). Pharmacological studies of kinins in venous smooth muscles. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59, 371-379.
- GERA, L. und STEWART, J.M. (1996a). A new class of bradykinin antagonists containing indanylglycine. *Immunopharmacology* 33, 174-177.

GERA, L., STEWART, J.M., WHALLEY, E.T., BURKARD, M. und ZUZACK, J.S. (1996b). New bradykinin antagonists having very high potency at B1 receptors. *Immunopharmacology* 33, 183-185.

GINSBERG, M.D. und BUSTO, R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20, 1627-1642.

GIULIAN, D. (1990). Microglia, cytokines, and cytotoxins: modulator of cellular responses after injury to the central nervous system. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 10: 15-21.

GLICKMAN, S.E., FRIED, L. und MORRISON, B.A. (1967). Shredding of nesting material in the Mongolian gerbil. *Percept. Mot. Skills* 24, 473-474.

GLICKMAN, S.E., HIGGINS, T.J. und ISAACSON, R.L. (1970). Some effects of hippocampal lesions on the behavior of Mongolian gerbils. *Physiol. Behav.* 5, 931-938

GOBEL, U., THEILEN, H. und KUSCHINSKY, W. (1990). Congruence of total and perfused capillary network in rat brains. *Circ. Res.* 66, 271-281.

GOBEL, U., THEILEN, H., SCHROCK, H. und KUSCHINSKY, W. (1991). Dynamics of capillary perfusion in the brain. *Blood Vessels* 28, 190-196.

GOODFELLOW, V.S., MARATHE, M.V., KUHLMAN, K.G., FITZPATRICK, T.D., CUADRADO, D., HANSON, W., ZUZACK, J.S., ROSS, S.E., WIECZOREK, M., BURKARD, M. und WHALLEY, E.T. (1996). Bradykinin receptor antagonists containing N-substituted amino acids: in vitro and in vivo B(2) and B(1) receptor antagonist activity. *J. Med. Chem.* 39, 1472-1484.

HACKE, W., BROTT, T., CAPLAN, L., MEIER, D., FIESCHI, C., VON, K.R., DONNAN, G., HEISS, W.D., WAHLGREN, N.G., SPRANGER, M., BOYSEN, G. und MARLER, J.R. (1999). Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology* 53, S3-14.

HACKE, W., KASTE, M., FIESCHI, C., TONI, D., LESAFFRE, E., VON, K.R., BOYSEN, G., BLUHMKI, E., HOXTER, G., MAHAGNE, M.H. und ET, A. (1995). Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) JAMA 274, 1017-1025.

HALLENBECK, J.M. (1996). Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. Adv. Neurol. 71: 281-97.

HALLENBECK, J.M., DUTKA, A.J., TANISHIMA, T., KOCHANNEK, P.M., KUMAROO, K.K., THOMPSON, C.B., OBRENOVITCH, T.P. und CONTRERAS, T.J. (1986). Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. Stroke 17, 246-253.

HAMBLIN, A., TAYLOR, M., BERNHAGEN, J., SHAKOOR, Z., MAYALL, S., NOBLE, G. und MCCARTHY, D. (1992). A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. J. Immunol. Methods 146, 219-228.

HANSON, W.L., MCCULLOUGH, R.G., SELIG, W.M., WIECZOREK, M., ROSS, S., WHALLEY, E.T., STEWART, J.M. und GERA, L. (1996). In vivo pharmacological profile of novel, potent, stable BK antagonists at B1 and B2 receptors. Immunopharmacology 33, 191-193.

HANYU, S., ITO, U., HAKAMATA, Y. und NAKANO, I. (1997). Topographical analysis of cortical neuronal loss associated with disseminated selective neuronal necrosis and infarction after repeated ischemia. Brain Res. 767, 154-157.

HARRISON, M.J., SEDAL, L., ARNOLD, J. und RUSSELL, R.W. (1975). No-reflow phenomenon in the cerebral circulation of the gerbil. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 38, 1190-1193.

- HEINEL, L.A., RUBIN, S., ROSENWASSER, R.H., VASTHARE, U.S. und TUMA, R.F. (1994). Leukocyte involvement in cerebral infarct generation after ischemia and reperfusion. *Brain Res. Bull.* 34, 137-141.
- HEISS, W.D. und ROSNER, G. (1983). Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Ann. Neurol.* 14, 294-301.
- HENDERSON, L.M., FIGUEROA, C.D., MÜLLER-ESTERL, W. und BHOOLA, K.D. (1994). Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood* 84, 474-482.
- HOFFMAN, W.E., THOMAS, C. und ALBRECHT, R.F. (1993). The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesth. Analg.* 76, 279-283.
- HOFFMANN, T.F., LEIDERER, R., WALDNER, H. und MESSMER, K. (1996). Bradykinin antagonists HOE-140 and CP-0597 diminish microcirculatory injury after ischemia-reperfusion of the pancreas in rats. *Br. J. Surg.* 83, 189-195.
- HOFFMANN, T.F., STEINBAUER, M., WALDNER, H. und MESSMER, K. (1996). Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury of pancreas in rats. *J. Surg. Res.* 62, 144-151.
- HOLLAND, J.A., PRITCHARD, K.A., PAPPOLLA, M.A., WOLIN, M.S., ROGERS, N.J. und STEMERMAN, M.B. (1990). Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 143, 21-25.
- HORI, S., OTA, S. und KONDO, M. (1971). Subcellular distribution of kininase activity in various tissues. *Mie. Med. J.* 20, 167-173.
- HOROBIN, R.W. und RASHID, F. (1990). Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chinese box model. *Histochemistry* 94, 205-209.

- HOSSMANN, K.A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36, 557-565.
- HOSSMANN, K.A. (1997). Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock* 8, 95-101.
- HOSSMANN, K.A., SCHMIDT, K.R. und GROSSE, O.B. (1987). Recovery of integrative central nervous function after one hour global cerebro-circulatory arrest in normothermic cat. *J. Neurol. Sci.* 77, 305-320.
- HUBER, A.R., KUNKEL, S.L., TODD, R.F. und WEISS, S.J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.
- ISHIZAKA, T., IWATA, M. und ISHIZAKA, A. (1980). Release of histamine and arachidonate from mouse mast cells induced by glycosylation-enhancing factor and bradykinin. *J. Immunol.* 134, 1880-1887.
- ITO, U., GO, K.G., WALKER-JT, J., SPATZ, M. und KLATZO, I. (1976). Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils III. Behaviour of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol. Berl.* 34, 1-6.
- ITO, U., OHNO, K., TOMITA, H. und INABA, Y. (1976). Cerebral changes during recirculation following temporary ischemia in mongolian gerbils. *Neurol.Med.Chir.(Tokyo)* 16, 313-22
- ITO, U., SPATZ, M., WALKER-JT, J. und KLATZO, I. (1975). Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol. Berl.* 32, 209-223.
- JEAN, W.C., SPELMAN, S.R., NUSSBAUM, E.S. und LOW, W.C. (1998). Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon. *Neurosurgery* 43: 1382-1396.

- JARROTT, D.M. und DOMER, F.R. (1980). A gerbil model of cerebral ischemia suitable for drug evaluation. *Stroke* 11, 203-209.
- KAHN, K. (1972). The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 22, 510-515.
- KAMIYA, T., KATAYAMA, Y., KASHIWAGI, F. und TERASHI, A. (1993). The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24, 571-575.
- KARIYA, K., KAWAUCHI, R. und OKAMOTO, H. (1981). Regional distribution of kininase in rat brain. *J. Neurochem.* 36, 2086-2088.
- KARIYA, K., OKAMOTO, H. und KIRA, K. (1984). Kinin-forming enzyme in rat brain mitochondria fraction and biological activity of a kinin released from rat plasma kininogen by this enzyme. *Jpn. J. Pharmacol.* 34, 203-210.
- KARIYA, K., YAMAUCHI, A., HATTORI, S., TSUDA, Y. und OKADA, Y. (1982). The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 1461-1466.
- KATO, H., ARAKI, T., MURASE, K. und KOGURE, K. (1992). Induction of tolerance to ischemia: alterations in second-messenger systems in the gerbil hippocampus. *Brain Res. Bull.* 29, 559-565.
- KATUSIC, Z.S., MILDE, J.H., COSENTINO, F. and MITROVIC, B.S. (1993). Subarachnoid hemorrhage and endothelial L-arginine pathway in small brain stem arteries in dogs. *Stroke* 24, 392-399.
- KATSUTA, K., NAKANISHI, H., SHIRAKAWA, K., YOSHIDA, K., TAKAGI, K. und TAMURA, A. (1995). The neuroprotective effect of the novel noncompetitive NMDA antagonist, FR115427 in focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 345-348.

- KEMPSKI, O. und BEHMANESH, S. (1997). Endothelial cell swelling and brain perfusion. *J. Trauma* 42, S38-S40.
- KETY, S.S. (1960). Measurement of local blood flow by the exchange of an inert, diffusible substance. *Methods Med. Res.* 8, 228-236.
- KINTNER, D.B., FITZPATRICK, J.H. und GILBOE, D.D. (1997). Hyperglycemic damage to mitochondrial membranes during cerebral ischemia: amelioration by Platelet-activating factor antagonist BN 50739. *J. Neurochem.* 69, 1219-1227.
- KIZUKI, K., SUZUKI, T., KUDO, M. und NOGUCHI, T. (1994a). Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res.* 634, 305-309.
- KIZUKI, K., SUZUKI, T., SUGAYA, K., NOGUCHI, T. und KUDO, M. (1994b). Tissue kallikrein in rat and mouse neurons. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 1891-1896.
- KLEIN, B., KUSCHINSKY, W., SCHROCK, H. und VETTERLEIN, F. (1986). Interdependency of local capillary density, blood flow, and metabolism in rat brains. *Am. J. Physiol.* 251, H1333-40.
- KOCHANEK, P.M., MELICK, J.A., SCHOETTLE, R.J., MAGARGEE, M.J., EVANS, R.W. und NEMOTO, E.M. (1990). Endogenous platelet activating factor does not modulate blood flow and metabolism in normal rat brain. *Stroke* 21, 459-462.
- KOCHANEK, P.M., NEMOTO, E.M., MELICK, J.A., EVANS, R.W. und BURKE, D.F. (1988). Cerebrovascular and cerebrometabolic effects of intracarotid infused platelet-activating factor in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8, 546-551.
- KOENIG, H.M., PELLIGRINO, D.A. und ALBRECHT, R.F. (1993). Halothane vasodilation and nitric oxide in rat pial vessels. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 5, 264-271.
- KOHNO, K., HOEHN, B.M., MIES, G., BACK, T. und HOSSMANN, K.A. (1995). Relationship between diffusion-weighted MR images, cerebral blood flow, and energy state in experimental brain infarction. *Magn. Reson. Imaging* 13, 73-80.

- KONTOS, H.A., WEI, E.P., POVLISHOCK, J.T. und CHRISTMAN, C.W. (1984). Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ. Res.* 55, 295-303.
- KROGH, A. (1919). The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J. Physiol. Lond.* 52, 457-474.
- KUBES, P., IBBOTSON, G., RUSSELL, J., WALLACE, J.L. and GRANGER, D.N. (1990). Role of platelet-activating factor in Ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.* 259, G300-G305.
- KUEHL, F.A. und EKGAN, R.A. (1980). Prostaglandines, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 210, 978-984.
- KUMAR, R., HARVEY, S.A., KESTER, M., HANAHAN, D.J. und OLSON, M.S. (1988). Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochem. Biophys. Acta* 963, 375-383.
- LEHR, H.A., SEEMÜLLER, J., HÜBNER, C., MENGER, M.D. and MESSMER, K. (1993). Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the Receptor for platelet-activating factor. *Arterioscler. Thromb.* 13, 1013-1018.
- LEVINE, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36, 1-17.
- LEVINE, S. und SOHN, D. (1969). Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch. Pathol.* 87, 315-317.
- LEVY, D.E. und BRIERLEY, J.B. (1974). Communications between vertebro-basilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp. Neurol.* 45, 503-508.
- LEVY, D.E., BRIERLEY, J.B. und PLUM, F. (1975). Ischaemic brain damage in the gerbil in the absence of 'no-reflow'. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 38, 1197-1205.

LINDSBERG, P.J., YUE, T.L., FRERICHS, K.U., HALLENBECK, J.M. und FEUERSTEIN, G. (1990). Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. *Stroke* 21, 1452-1457.

LONGSTRETH, J., DIEHR, P. und INUI, T.S. (1983). Prediction of awakening after out-of-hospital cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* 308, 1378-1382.

LOPES, P., KAR, S., CHRETIEN, L., REGOLI, D., QUIRION, R. und COUTURE, R. (1995). Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 68, 867-881.

LOPES, P., KAR, S., TOUSIGNANT, C., REGOLI, D., QUIRION, R. und COUTURE, R. (1993). Autoradiographic localization of [125I-Tyr8]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse* 15, 48-57.

LOPEZ, J.A., ARMSTRONG, M.L., HARRISON, D.G., PIEGORS, D.J. und HEISTAD, D.D. (1989). Vascular responses to leukocyte products in atherosclerotic primates. *Circ. Res.* 65, 1078-1086.

LORANT, D.E., PATEL, K.D., MCINTYRE, T.M., MCEVER, R.P., PRESCOTT, S.M. und ZIMMERMAN, G.A. (1991). Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115, 223-234.

LORENZL, S., KODEL, U., FREI, K. und PFISTER, H.W. (1996). Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 308, 335-341.

MA, X.L., WEYRICH, A.S., KRANTZ, S. und LEFER, A.M. (1992). Mechanisms of the cardioprotective actions of WEB-2170, bapafant, a platelet activating factor antagonist, in myocardial ischemia and reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 1229-1236.

MA, Y.P., KOO, A., KWAN, H.C. und CHENG, K.K. (1974). On-line measurement of the dynamic velocity of erythrocytes in the cerebral microvessels in the rat. *Microvasc. Res.* 8, 1-13.

MAIER-HAUFF, K., BAETHMANN, A.J., LANGE, M., SCHURER, L. und UNTERBERG, A. (1984). The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J. Neurosurg.* 61, 97-106.

MAKEVNINA, L.G., LOMOVA, I.P., ZUBKOV YUN und SEMENYUTIN, V.B. (1994). Kininogen consumption in cerebral circulation of humans during brain ischemia and postischemic reperfusion. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 1955-1963.

MANNING, D.C. und SNYDER, S.H. (1989). Bradykinin receptors localized by quantitative autoradiography in kidney, ureter, and bladder. *Am. J. Physiol.* 256, F909-F915.

MANTEL, N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Can. Chemother. Rep.* 50, 163-170.

MARCHESELLI, V.L., ROSSOWSKA, M.J., DOMINGO, M.T., BRAQUET, P. und BAZAN, N.G. (1990). Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 265, 9140-9145.

MARTI, H.J., BERNAUDIN, M., BELLAIL, A., SCHOCH, H., EULER, M., PETIT, E. und RISAU, W. (2000) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am. J. Pathol.* 156, 965-976.

MATSUO, Y., KIHARA, T., IKEDA, M., NINOMIYA, M., ONODERA, H. und KOGURE, K. (1995). Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 941-947.

MATSUO, Y., ONODERA, H., SHIGA, Y., NAKAMURA, M., NINOMIYA, M., KIHARA, T. und KOGURE, K. (1994a). Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25, 1469-1475.

MATSUO, Y., ONODERA, H., SHIGA, Y., SHOZUHARA, H., NINOMIYA, M., KIHARA, T., TAMATANI, T., MIYASAKA, M. und KOGURE, K. (1994b). Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 656, 344-352.

MCGRAW, C.P. (1977). Experimental cerebral infarction: effects of pentobarbital in Mongolian gerbils. *Arch. Neurol.* 34, 334-336.

MICHENFELDER, J.D. und MILDE, J.H. (1975). Cerebral protection by anaesthetics during ischaemia: a review. *Resuscitation* 4, 219-233.

MILLER, F.N., SIMS, D.E., SCHUSCHKE, D.A. und ABNEY, D.L. (1992). Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc. Res.* 44, 166-184.

MOLINARI, G.F. (1988). Why model strokes? *Stroke* 19, 1195-1197.

MINATO, H., MASUDA, Y., FUJITANI, B. und HOSOKI, K. (1997). Post-treatment of transient focal cerebral ischemia in rats with the novel cerebrovascular-selective Ca²⁺ channel antagonist (+/-)-(E)-1-(3-fluoro-6, 11-dihydrodibenz(b,e)-oxepine-11-yl)-4-(3-phenyl-2-propenyl)-piperazine dimaleate. *Arzneimittelforschung.* 47, 799-802.

MONTRUCCHIO, G., ALLOATTI, G., MARIANO, F., COMINO, A., CACACE, G., POLLONI, R., DE FILIPPI, P.G., EMANUELLI, G. und CAMUSSI, G. (1993). Role of platelet-activating factor in polymorphonuclear neutrophil recruitment in reperfused ischemic rabbit heart. *Am. J. Pathol.* 142, 471-480.

MORBIDELLI, L., PARENTI, A., GIOVANNELLI, L., GRANGER, H., LEDDA, F. und ZICHE, M. (1998). B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular

endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1286-1292.

MORGENSTERN, L.B. (1997). rtPA in acute ischemic stroke: the North American perspective. *Neurology* 49, S63-S65.

MORI, E., DEL ZOPPO, G.J., CHAMBERS, J.D., COPELAND, B.R. und ARFORS, K.E. (1992). Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 23, 712-718.

MRSULJA, B.B., MRSULJA, B.J., ITO, U., WALKER-JT, J., SPATZ, M. und KLATZO, I. (1975). Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta Neuropathol. Berl.* 33, 91-103.

MRSULJA, B.B., MRSULJA, B.J., SPATZ, M., ITO, U., WALKER-JT, J. und KLATZO, I. (1976). Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. IV. Behaviour of biogenic amines. *Acta Neuropathol. Berl.* 36, 1-8.

NASH, G.B., JONES, J.G., MIKITA, J., CHRISTOPHER, B. und DORMANDY, J.A. (1988). Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br. J. Haematol.* 70, 171-176.

NILSSON, B., ASTRUP, J., BLENNOW, G. und SIESJÖ, B.K. (1977). Cerebral function and energy metabolism at critical thresholds of oxygen availability: a study in rats during status epilepticus induced by bicuculline. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 64, 112-113.

NINIO, E., MENCIA, H.J., HEYMANS, F. und BENVENISTE, J. (1982). Biosynthesis of platelet-activating factor. I. Evidence for an acetyl-transferase activity in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Acta* 710, 23-31.

NOURSHARGH, S., LARKIN, S.W., DAS, A. und WILLIAMS, T.J. (1995). Interleukin-1-induced leukocyte extravasation across rat mesenteric microvessels is mediated by platelet-activating factor. *Blood* 85, 2553-2558.

OBERPICHLER, H., SAUER, D., ROSSBERG, C., MENNEL, H.D. und KRIEGLSTEIN, J. (1990). PAF antagonist ginkgolide B reduces postischemic neuronal damage in rat brain hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 133-135.

OLIVEIRA, E.B., MARTINS, A.R. und CAMARGO, A.C. (1976). Isolation of brain endopeptidases: influence of size and sequence of substrates structurally related to bradykinin. *Biochemistry* 15, 1967-1974.

PANETTA, T., MARCHESELLI, V.L., BRAQUET, P., SPINNEWYN, B. und BAZAN, N.G. (1987). Effects of a platelet activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia-reperfusion induced cerebral injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 580-587.

PAPADOPOULOS, S.M., CHANDLER, W.F., SALAMAT, M.S., TOPOL, E.J. und SACKELLARES, J.C. (1987). Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J. Neurosurg.* 67, 394-398.

PARK, T.S., GONZALES, E.R. und GIDDAY, J.M. (1999). Platelet-activating factor mediates ischemia-induced leukocyte-endothelial adherence in newborn pig brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 417-424.

PAWLIK, G., RACKL, A. und BING, R.J. (1981). Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res.* 208, 35-58.

PERRY, D.C. und SNYDER, S.H. (1984). Identification of bradykinin in mammalian brain. *J. Neurochem.* 43, 1072-1080.

POWELL, D.W. (1992). Epithelial secretory responses to inflammation. Platelet activating factor and reactive oxygen metabolites. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 664, 232-247.

PRAT, A., BIERNACKI, K., POULY, S., NALBANTOGLU, J., COUTURE, R. und ANTEL, J.P. (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 896-906.

PREHN, J.H. und KRIEGLSTEIN, J. (1993). Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* 34, 179-188.

PRIVITERA, P.J. (1992). Brain kallikrein-kinin system in arterial pressure regulation. *Agents Actions Suppl.* 38, 39-46.

PULSINELLI, W.A. und BRIERLEY, J.B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10, 267-272.

PULSINELLI, W.A., BRIERLEY, J.B. und PLUM, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 11, 491-498.

RAIDOO, D.M., RAMCHURREN, N., NAIDOO, Y., NAIDOO, S., MÜLLER-ESTERL, W. und BHOOLA, K.D. (1996). Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology* 22, 104-107.

RAIDOO, D.M., RAMSAROOP, R., NAIDOO, S. und BHOOLA, K.D. (1996). Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 32, 39-47.

RASHID, F. und HOROBIN, R.W. (1990). Interaction of molecular probes with living cells and tissues. Part 2. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. *Histochemistry* 94, 303-308.

REGOLI, D. und BARABE, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32, 1-46.

REGOLI, D., PHENG, L.H., NSA ALLOGHO, S., NGUYEN-LE, X.K. und GOBEIL, F.(1996). Receptors for kinins: From classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology* 33, 24-31.

REGOLI, D., BARABE, J. und PARK, W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aorae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 855-867.

RELTON, J.K., BECKEY, V.E., HANSON, W.L. und WHALLEY, E.T. (1997). CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 28, 1430-1436.

RHALEB, N.E., DION, S., BARABE, J., ROUISSI, N., JUKIC, D., DRAPEAU, G. und REGOLI, D. (1989). Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur.J.Pharmacol.*162, 419-427.

ROT, A. (1992). Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* 13, 291-294.

ROVAINEN, C.M., WOOLSEY, T.A., BLOCHER, N.C., WANG, D.B. und ROBINSON, O.F. (1993). Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13, 359-371.

SAITO, R., GRAF, R., HUBEL, K., FUJITA, T., ROSNER, G. und HEISS, W.D. (1997). Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 857-864.

SAITO, R., GRAF, R., HUBEL, K., TAGUCHI, J., ROSNER, G., FUJITA, T. und HEISS, W.D. (1995). Halothane, but not alpha-chloralose, blocks potassium-evoked cortical spreading depression in cats. *Brain Res.* 699, 109-115.

- SANCHEZ, C.M., ALONSO, F., GARCIA, G.M., GOMEZ, C.J. und NIETO, M.L. (1985). Synthesis of platelet-activating factor from human polymorphonuclear leukocytes: regulation and pharmacological approaches. *Int. J. Tissue React.* 7, 345-349.
- SARRAF, Y.S., SHENG, H., BRINKHOUS, A.D., PEARLSTEIN, R.D. und WARNER, D.S. (1999). Effects of postischemic halothane administration on outcome from transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 11, 31-36.
- SATOH, K., KOYAMA, M., YOSHIDA, H. und TAKAMATSU, S. (1996). Production of platelet-activating factor by porcine brain microvascular endothelial cells in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416: 17-20.
- SATOH, K., YOSHIDA, H., IMAIZUMI, T., KOYAMA, M., und TAKAMATSU, S. (1995). Production of platelet-activating factor by porcine brain microvascular endothelial cells in culture. *Thromb. Haemost.* 74: 1335-1339.
- SCHALL, T.J. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 3, 165-183.
- SCHMID SCHÖNBEIN, G.W. (1987). Leukocyte kinetics in the microcirculation. *Biorheology* 24, 139-151.
- SCHMID SCHÖNBEIN, G.W. und ENGLER, R.L. (1990). Perspectives of leukocyte activation in the microcirculation. *Biorheology* 27, 859-869.
- SCHMID SCHÖNBEIN, G.W. und GRANGER, D.N. (1995). Physiology and pathophysiology of leukocyte adherence. New York, Oxford University Press.
- SCHÜRER, L., GRÖGAARD, B., GERDIN, B., KEMPSKI, O. und ARFORS, K.-E. (1991). Leucocyte depletion does not affect post-ischemic nerve cell damage in the rat. *Acta Neurochir.* 111, 54-60.
- SCHÜRER, L., KAWAMURA, S., KEMPSKI, O., GOETZ, A. und BAETHMANN, A. (1989) The closed cranial window technique for the investigation of blood-brain barrier

function and vasomotor control, in: *Progress in Applied Microcirculation*. MESSMER, K. und HAMMERSEN, F. (Eds.). Karger, S, Basel, pp. 32-41.

SCHÜRER, L., KAWAMURA, S., SCHMUCKER, B. und BAETHMANN, A. (1988). Vasomotoric and blood-brain barrier effects of rat brain surface vessels during hypercapnia and superfusion with Na-arachidonate. *Int. J. Microcirc.* 7, S82.

SEJBAL, J., WANG, Y., CANN, J.R., STEWART, J.M., GERA, L. und KOTOVYCH, G. (1997). A comparative NMR and molecular dynamics study of the conformations of bradykinin B1 and B2, B2, and B1-specific receptor antagonists B-9430, B-9436, and B-9858. *Biopolymers* 42, 521-535.

SHIGA, Y., ONODERA, H., MATSUO, Y. und KOGURE, K. (1992). Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res.* 595, 145-148.

SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S., GUTE, D.C. und KORTHUIS, R.J. (1999a). Bradykinin prevents postischemic leukocyte adhesion and emigration and attenuates microvascular barrier disruption. *Am. J. Physiol.* 277, H161-H171.

SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S., GUTE, D.C. und KORTHUIS, R.J. (1999b). Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. *Am. J. Physiol.* 277, H152-H160.

SIEMKOWICZ, E. und HANSEN, A.J. (1978). Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurol. Scand.* 58, 1-8.

SIESJÖ, B.K., KATSURA, K., ZHAO, Q., FOLBERGROVA, J., PAHLMARK, K., SIESJO, P. und SMITH, M.L. (1995). Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J. Neurotrauma* 12, 943-956.

SIESJÖ, B.K. und SIESJO, P. (1996). Mechanisms of secondary brain injury. *Eur. J. Anaesthesiol.* 13, 247-268.

- SIMSON, J.A., CHAO, J., DOM, R., CHAO, L. und MARGOLIUS, H.S. (1986). Kallikrein localization in rat brain by immunohistochemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 198 Pt B, 129-133.
- SMITH, A.L., LARSON-CP, J. und HOFF, J.T. (1973). Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology* 39, 377-381.
- SMITH, S.E. und MELDRUM, B.S. (1995). Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal ischemia on rats. *Stroke* 26, 117-121.
- SPINNEWYN, B., BLAVET, N., CLOSTRE, F., BAZAN, N. und BRAQUET, P. (1987). Involvement of platelet-activating factor (PAF) in cerebral post- ischemic phase in Mongolian gerbils. *Prostaglandins* 34, 337-349.
- SPRINGER, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- SPRINGER, T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation und leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 827-872.
- STANIMIROVIC, D. und SATOH, K. (2000). Inflammatory mediators of cerebral endothelium: A role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathology* 10: 113-126.
- STOLL, G., JANDER, S. und SCHROETER, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* 56: 149-171.
- STUMMER, W., WEBER, K., TRANMER, B., BAETHMANN, A. und KEMPSKI, O. (1994). Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 25, 1862-1869.
- SUZUKI, H., ABE, K., TOJO, S., KIMURA, K., MIZUGAKI, M. und ITOYAMA, Y. (1998). A change of P-selectin immunoreactivity in rat brain after transient and permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol. Res.* 20, 463-469.

SUZUKI, H., ABE, K., TOJO, S., MOROOKA, S., KIMURA, K., MIZUGAKI, M. und ITOYAMA, Y. (1997). Postischemic expression of P-selectin immunoreactivity in rat brain. *Neurosci. Lett.* 228, 151-154.

SWERLICK, R.A., LEE, K.H., LI, L.J., SEPP, N.T., CAUGHMAN, S.W. und LAWLEY, T.J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 698-705.

TAKESHIMA, R., KIRSCH, J.R., KOEHLER, R.C., GOMOLL, A.W. und TRAYSTMAN, R.J. (1992). Monoclonal leukocyte antibody does not decrease the injury of transient focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 23, 247-252.

TAMURA, A., GRAHAM, D.I., MCCULLOCH, J. und TEASDALE, G.M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1, 53-60.

TAYEH, M.A. und SCICLI, A.G. (1998). Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P- selectin on the surface of endothelial cells in culture. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 110, 412-421.

THEILEN, H., SCHROCK, H. und KUSCHINSKY, W. (1993). Capillary perfusion during incomplete forebrain ischemia and reperfusion in rat brain. *Am. J. Physiol.* 265, H642-H648.

THEILEN, H., SCHROCK, H. und KUSCHINSKY, W. (1994). Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 1055-1061.

TIFFANY, C.W. und BURCH, R.M. (1989). Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 247, 189-192.

- TOKUMURA, A., KAMIYASU, K., TAKAUCHI, K. und TSUKATANI, H. (1987). Evidence for existence of various homologues and analogues of platelet activating factor in a lipid extract of bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 415-425.
- TUPPER, D.E. und WALLACE, R.B. (1980). Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol. Exp. Warsz.* 40, 999-1003.
- UHL, E., PICKELMANN, S., BAETHMANN, A. und SCHURER, L. (1999a). Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Systemic application. *Stroke* 30, 873-879.
- UHL, E., PICKELMANN, S., ROHRICH, F., BAETHMANN, A. und SCHURER, L. (1999b). Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. *Stroke* 30, 880-886.
- UNTERBERG, A. und BAETHMANN, A.J. (1984a). The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J. Neurosurg.* 61, 87-96.
- UNTERBERG, A., WAHL, M. und BAETHMANN, A. (1984b). Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4, 574-585.
- USKI, T.K. und REINSTRUP, P. (1990). Actions of platelet-activating factor on isolated feline and human cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 428-431.
- VASTHARE, U.S., HEINEL, L.A., ROSENWASSER, R.H. und TUMA, R.F. (1990). Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Surg. Neurol.* 33, 261-265.
- VESTWEBER, D. und BLANKS, J.E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79, 181-213.

VILLRINGER, A., HABERL, R.L., DIRNAGL, U., ANNESER, F., VERST, M. und EINHAUPL, K.M. (1989). Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res.* 504, 159-160.

VILLRINGER, A., THEM, A., LINDAUER, U., EINHÄUPL, K. und DIRNAGL, U. (1994). Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study. *Circ. Res.* 75, 55-62.

VON ANDRIAN, U.H., HANSELL, P., CHAMBERS, J.D., BERGER, E.M., TORRES FILHO, I., BUTCHER, E.C. und ARFORS, K.E. (1992). L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am. J. Physiol.* 263, H1034-44.

WARNER, D.S., MCFARLANE, C., TODD, M.M., LUDWIG, P. und MCALLISTER, A.M. (1993). Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation. *Anesthesiology* 79, 985-992.

WARNER, D.S., ZHOU, J.G., RAMANI, R. und TODD, M.M. (1991). Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, und methohexital anesthesia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11, 794-802.

WATSON, B.D., DIETRICH, W.D., BUSTO, R., WACHTEL, M.S. und GINSBERG, M.D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 17, 497-504.

WATSON, C.J., LUDDINGTON, R., ST JOHN COLLIER, D.G., CALNE, R.Y. und METCALFE, S.M. (1993). The platelet-activating factor antagonist WEB 2170. Its beneficial effect on dog renal allograft survival. *Transplantation* 56, 1047-1049.

WEBER, K. (1989). Zentrale und systemische Veränderungen nach zerebraler Ischämie bei der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). Inaugural-Dissertation, Tiermedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

WEBER, K., BAETHMANN, A. und KEMPSKI, O. (1988). Determinants of survival after forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Metab. Brain Dis.* 3, 247-255.

WEISS, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-376.

WELBOURN, C.R., GOLDMAN, G., PATERSON, I.S., VALERI, C.R., SHEPRO, D. und HECHTMAN, H.B. (1991). Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br. J. Surg.* 78, 651-655.

WHALLEY, E.T., AMURE, Y.O. und LYE, R.H. (1987). Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar artery in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 335, 433-437.

WHALLEY, E.T., FRITZ, H. und GEIGER, R. (1983). Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 324, 296-301.

WHALLEY, E.T., HANSON, W.L., STEWART, J.M. und GERA, L. (1997). Oral activity of peptide bradykinin antagonists following intragastric administration in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 629-632.

WHALLEY, E.T. und WAHL, M. (1983). Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 323, 66-71.

WIEMER, G., POPP, R., SCHOLKENS, B.A. und GOGELIN, H. (1994). Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 638, 261-266.

WILLIAMS, J.L., SHEA, M. und JONES, S.C. (1993). Evidence that heterogeneity of cerebral blood flow does not involve vascular recruitment. *Am. J. Physiol.* 264, H1740-3.

WINDISCHHOFER, W. und LEIS, H.J. (1997). [3H]bradykinin receptor-binding, receptor-recycling, and receptor-internalization of the B2 bradykinin receptor in the murine osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *J. Bone Miner Res.* 12 (10), 1615-1625.

WOLFF, H. und BLUNT, D.G. (1929). The cerebral circulation. VI. The effect of normal and of increased intracranial cerebrospinal fluid pressure on the velocity of intracranial blood flow. *Arch. Neurol. Psychiat. Chicago* 21, 795-804.

WYKLE, R.L., MALONE, B. und SNYDER, F. (1980). Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J. Biol. Chem.* 255, 10256-10260.

XU, J., HSU, C.Y., JUNKER, H., CHAO, S., HOGAN, E.L. und CHAO, J. (1991). Kininogen and kinin in experimental spinal cord injury. *J. Neurochem.* 57, 975-980.

YAMAKAWA, T., YAMAGUCHI, S., NIIMI, H. und SUGIYAMA, I. (1987). White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study. *Circ. Shock* 22, 323-332.

ZABLOCKA, B., LUKASIUK, K., LAZAREWICZ, J.W. und DOMANSKA JANIK, K. (1995). Modulation of ischemic signal by antagonists of N-methyl-D- aspartate, nitric oxide synthase, and platelet-activating factor in gerbil hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 40, 233-240.

ZETTER, B. (1988). Endothelial heterogeneity: Influence of vessel size, organ localization, and species specificity on the properties of cultured endothelial cells. *Endothelial Cells II*, 63-79, Raven Press.

ZHANG, R., CHOPP, M., ZHANG, Z., JIANG, N. und POWERS, C. (1998). The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 785, 207-214.

ZHANG, R.L., CHOPP, M., JIANG, N., TANG, W.X., PROSTAK, J., MANNING, A.M. und ANDERSON, D.C. (1995). Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 26, 1438-1442.

ZHANG, R.L., CHOPP, M., LI, Y., ZALOGA, C., JIANG, N., JONES, M.L., MIYASAKA, M. und WARD, P.A. (1994). Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* 44, 1747-1751.

ZHANG, R.L., CHOPP, M., ZALOGA, C., ZHANG, Z.G., JIANG, N., GAUTAM, S.C., TANG, W.X., TSANG, W., ANDERSON, D.C. und MANNING, A.M. (1995). The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res.* 682, 182-188.

ZIMMERMAN, G.A., ELSTAD, M.R., LORANT, D.E., MCLNTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., TOPHAM, M.K., WEYRICH, A.S. und WHATLEY, R.E. (1996). Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416, 297-304.

7 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Proceedings:

Lehmberg J, Beck J, Baethmann A und Uhl E.

Influence of a Bradykinin B1/B2-Receptor-Antagonist B 9430 on the cerebral microcirculation and outcome of gerbils from global cerebral ischemia.

Acta Neurochir (2000) [Suppl], 76: 39-41.

Abstracts:

Lehmberg J, Beck J, Baethmann A und Uhl E.

Reduction of leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia by the bradykinin antagonist CP 0597.

J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17 (Suppl 1): 713.

Lehmberg J, Baethmann A und Uhl E.

Inhibition of leukocyte-endothelial interactions in global cerebral ischemia by the bradykinin B2-receptor-antagonist CP 0597.

Cerebrovasc Dis 1998; 8 (Suppl 4): 76.

Lehmberg J, Baethmann A und Uhl E.

Effect of the bradykinin B2-receptor-antagonist CP 0597 leukocyte-endothelium interactions and pial arterioles in global cerebral ischemia.

J Vasc Res 1998; 35 (Suppl 2): 35.

Lehmberg J, Beck J, Baethmann A und Uhl E.

Reduction of leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia by the bradykinin B1/B2-receptor-antagonist B 9430.

J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19 (Suppl 1): S573.

8 Danksagung

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung, Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie von Prof. Dr. A. Baethmann durchgeführt. Das Projekt wurde von Herrn PD Dr. E. Uhl (Neurochirurgische Klinik) betreut und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Uh/64-2) unterstützt.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Meßmer danken. Durch die freundliche Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung hat er meine wissenschaftliche Ausbildung maßgeblich geprägt. Die produktive Atmosphäre und Professionalität im Institut waren mir stets Ansporn, der wissenschaftliche Anspruch, das enorme Wissen und die Exaktheit des Direktors Vorbild.

Herrn Prof. Baethmann sei für die Integration in seine Arbeitsgruppe herzlich gedankt. Sein unermüdlicher Einsatz für die Ausbildung seiner Assistenten und Doktoranden nicht nur in der Wissenschaft und Klinik sondern auch in gesellschaftlichen Werten wurden für mich Sinnbild akademischen Denkens und Handelns.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Uhl danken. Er überließ mir das Thema der vorliegenden Arbeit. Mit seiner fachlichen Kompetenz und Erfahrung stand mir ein Partner zur Seite, mit dem jedes Problem gelöst werden konnte. Er fand jederzeit das richtige Mittelmaß zwischen Bestimmtheit und Freizügigkeit, was die Zusammenarbeit sehr effektiv gestaltete. Die anregenden und kritischen fachlichen Diskussionen haben mein wissenschaftliches Denken maßgeblich bestimmt.

Frau Dr. Dr. R. Leiderer hat freundlicherweise die der elektronenmikroskopischen Aufnahmen anfertigt und war ein wichtiger Diskussionspartner bei der Durchsicht dieser Aufnahmen. Frau M. Fürst und C. Guggenmos haben mich tatkräftig bei der Anfertigung der histologischen Präparate unterstützt. Allen drei Damen einen herzlichen Dank.

Der Kollegialität und Hilfsbereitschaft jedes einzelnen Mitarbeiters des Instituts für Chirurgische Forschung ist die hervorragende Arbeitsatmosphäre zu verdanken.

9 Lebenslauf

Jens Matthias Lehmberg

Geburtsdatum 07. Mai 1972

Eltern Hildegunde Lehmberg, Oberstudienrätin
und Dr. jur. Dietrich Lehmberg, Ministerialrat

Geschwister Kirsten Lehmberg, Regierungsrätin

Schulbildung 1982-1991 Gymnasium am Ölberg, Königswinter
Mai 1991 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst 1991-1992 Wehrdienst als Gebirgsjäger in Berchtesgaden
1992-1994 Ausbildung zum Offizier der Reserve

Studium 1992-1994 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

1994-1995 Humanmedizin an der Universität Innsbruck

1995-1999 Ludwig-Maximilians-Universität München

Co-Assistent Anatomie Präparierkurs und anatomische Kolloquien

Praktisches Jahr Chirurgie Hôpital Ambroise Paré, Paris, Frankreich, Direktor: Prof.
Dr. B. Nordlinger

Neurologie Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich, Direktor:
Prof. Dr. G. Rancurel

Mass. General Hospital, Harvard Medical School,
Boston, USA, Direktor: Dr. A. Young

Innere Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München,
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. P. Scriba

Mai 1999 Drittes Staatsexamen

Beruf	1999-2001	<p>Arzt im Praktikum: Bearbeitung des Forschungsprojekts „Ödemausbreitung und –rückbildung beim Hirnödem nach intrazerebraler Blutung“, gefördert durch das BMBF. Arbeitsplatz: Institut für Chirurgische Forschung (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer), Arbeitsgruppe für Experimentelle Neurochirurgie (Leiter: Prof. Dr. A. Baethmann), Projektleiter: PD Dr. E. Uhl (Neurochirurgie).</p> <p>Begleitend hierzu 2. Diensthabender der Neurochirurgischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Reulen bzw. Prof. Dr. J.-C. Tonn) sowie Tätigkeiten auf der Neurochirurgischen Intensiv- und Normalstation.</p>
	2001	Wissenschaftlicher Assistent: am Institut für Chirurgische Forschung.
	seit 12/2001	Wissenschaftlicher Assistent: Neurochirurgische Klinik, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (Direktor: Prof. Dr. J. Zentner).