

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

Komm. Direktor Prof. Dr. U. Pohl

Die Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation

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

Vorgelegt von
Maximilian Josef Waldner
aus
Traunstein
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Uhl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Haberl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Dichgans

Priv. Doz. Dr. A. Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Problematik	1
1.2	Pathophysiologie des ischämischen Sekundärschadens	1
1.3	Das Kallikrein-Kinin System und seine Bedeutung für den ischämischen Sekundärschaden	3
1.4	Fragestellung	5
2	Methodik	7
2.1	Versuchstiere	7
2.2	Experimentelles Modell	7
2.2.1	Anästhesie	7
2.2.2	Temperatur	8
2.2.3	Chirurgische Präparation	8
2.2.4	Laserdoppler-Fluxmetrie	9
2.2.5	Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe	10
2.2.6	Bestimmung des kleinen Blutbildes	12
2.2.7	Intravitalmikroskopie	12
2.2.8	Histologie	18
2.2.9	Versuchsprotokoll	19
2.3	Bradykinin und Bradykinin-Antagonisten	20
2.3.1	Bradykinin	20
2.3.2	Bradykinin B1-Antagonist	20
2.3.3	Bradykinin B2-Antagonist	21
2.4	Versuchsgruppen	22
2.5	Statistik	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Thrombozytenfunktion	25
3.1.1	Thrombozytenfunktion in vitro	25
3.1.2	Thrombozytenfunktion in vivo	26
3.2	Dosisfindung	29

3.2.1	<i>Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur</i>	29
3.2.2	<i>Blutwerte von Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin</i>	30
3.2.3	<i>Gefäßdurchmesser</i>	31
3.2.4	<i>Leukozyten-Endothelinteraktionen</i>	33
3.2.5	<i>Thrombozyten-Endothelinteraktionen</i>	35
3.2.6	<i>Funktionelle Kapillardichte</i>	36
3.2.7	<i>Laser-Doppler-Fluxmetrie</i>	37
3.2.8	<i>Arterio-venöse Transitzeit</i>	39
3.2.9	<i>Histologie</i>	40
3.3	Bradykininrezeptor-Antagonisierung	42
3.3.1	<i>Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur</i>	42
3.3.2	<i>Blutwerte von Leukozyten, Thrombozyten und Hämatokrit</i>	43
3.3.3	<i>Gefäßdurchmesser</i>	44
3.3.4	<i>Leukozyten-Endothelinteraktionen</i>	45
3.3.5	<i>Thrombozyten-Endothelinteraktionen</i>	47
3.3.6	<i>Funktionelle Kapillardichte</i>	48
3.3.7	<i>Laser-Doppler-Fluxmetrie</i>	49
3.3.8	<i>Arterio-venöse Transitzeit</i>	51
3.3.9	<i>Histologie</i>	52
3.4	Intravitalmikroskopische Aufnahmen	53
3.5	Histologische Aufnahmen	56
4	Diskussion	59
4.1	Experimentelles Modell	59
4.1.1	<i>Verwendung eines Tiermodells</i>	59
4.1.2	<i>Auswahl des Versuchstiers</i>	59
4.1.3	<i>Anästhesie</i>	60
4.1.4	<i>Bradykinin-Infusion</i>	61
4.2	Untersuchung der Mikrozirkulation	62
4.2.1	<i>Leukozyten-Endothelinteraktionen</i>	65
4.2.2	<i>Thrombozyten-Endothelinteraktionen</i>	67
4.2.3	<i>Funktionelle Kapillardichte</i>	68
4.2.4	<i>Quantifizierung der mikrovaskulären Durchblutung</i>	69
4.3	Histologie	71
4.4	Ergebnisse	72

4.4.1	<i>Thrombozytenfunktion</i>	72
4.4.2	<i>Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation</i>	73
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturliste	89
7	Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	113
7.1	Abstracts	113
7.2	Originalarbeiten	113
8	Danksagung	115
9	Lebenslauf	117

1 Einleitung

1.1 Klinische Problematik

Der ischämische Hirnschaden ist die häufigste Ursache für eine bleibende körperliche Behinderung in der Bevölkerung [185]. Als Ischämie bezeichnet man dabei die Abnahme der Durchblutung eines Gewebes. Je nach Ausmaß der Minderperfusion kommt es zuerst zu einer Hemmung der Funktion, gefolgt von einer Hemmung des Metabolismus und zuletzt einer Schädigung der Struktur. Dabei wird zwischen einer globalen und einer fokalen zerebralen Ischämie unterschieden [43, 95]. Bei der globalen Ischämie betrifft die Durchblutungsabnahme das gesamte ZNS oder den größten Anteil beider Hemisphären. Sie resultiert z.B. aus einem Herz-Kreislaufstillstand oder einer Hypotension in Folge von schweren Blutungen bei Polytrauma, Narkosezwischenfällen oder Herzrhythmusstörungen. Im Gegensatz dazu ist bei der fokalen Ischämie nur ein bestimmter Bereich des Gehirns betroffen. Bei einem Schlaganfall handelt es sich in 85% der Fälle um eine akute fokale zerebrale Ischämie, verursacht durch den Verschluss einzelner Hirnarterien durch Thrombose oder Embolie. Selten wird die Minderperfusion auch durch eine Verlegung von Hirnvenen oder den großen venösen Blutleitern (Sinus) hervorgerufen. In 15% der Fälle ist der Schlaganfall Folge einer spontanen intrazerebralen oder subarachnoidalen Blutung. In Deutschland erleiden pro Jahr etwa 180 Patienten pro 100.000 Einwohner einen Schlaganfall, die 1-Jahres-Überlebens-Rate liegt unter 65% [79].

Neben dem primären Gewebeschaden kommt es sekundär zu einer entzündungsbedingten Schädigung des Gewebes [24, 72]. Da der primäre Schaden aufgrund des eingeschränkten Regenerationspotentials des Gehirns nicht therapierbar ist, kommt der Hemmung des sekundären Hirnschadens eine besondere Bedeutung zu. Um eine zielgerichtete Therapie zu ermöglichen, ist dazu das genaue Verständnis der pathophysiologischen Abläufe notwendig.

1.2 Pathophysiologie des ischämischen Sekundärschadens

Die einzelnen Mechanismen, die zur Ausbildung des sekundären Hirnschadens führen, sind bisher nur unzureichend verstanden. Eine Reifung („maturation phenomenon“) nach zerebraler Ischämie wurde 1975 erstmals von Ito et al. beschrieben [62]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach zerebraler Ischämie Neurone in selektiv vulnerablen Hirnarealen wie dem Hippocampus nicht unmittelbar, sondern erst nach einem gewissen Zeitraum zugrunde gehen. Das Prinzip der Reifung wurde auch beim Schädel-Hirntrauma, der Subarachnoidalblutung und zahlreichen anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems beschrieben [4, 106, 163].

Die initiale Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen führt zu einer direkten Schädigung der Neurone. Dabei kommt es zu einem Abfall der ATP-Konzentration im ischämischen Parenchym. Diesem folgt eine verminderte Aktivität der Na/K-ATPase, es kommt zu einer Membrandepolarisation durch einen Abfall der intrazellulären Kalium-Konzentration und einem Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration. Eine erhöhte Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter, wie z.B. Glutamat oder Dopamin, führt direkt zu einer Nervenschädigung. Ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirkt die Aktivierung verschiedener Proteasen und die Bildung freier Radikale und führt dadurch zum ischämischen Zelltod [87, 95].

Zusätzlich treten Veränderungen der Mikrozirkulation auf, welche die kardinalen Symptome der Entzündungsreaktion widerspiegeln. So kommt es zu einer Vasodilatation zerebraler Gefäße, verzögert zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und zur Ausbildung eines vasogenen Hirnödems. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse des Gehirns resultiert daraus ein erhöhter intrakranieller Druck. Dieser wiederum führt zu einer Abnahme des Perfusionsdrucks und einer weiteren Abnahme der Blutversorgung des Gehirns [44-46].

Einen weiteren Schädigungsmechanismus stellt die Aktivierung von Leukozyten in der Mikrozirkulation dar. In zahlreichen Organsystemen, Spezies und bei verschiedenen Krankheitsbildern wurden Leukozyten-Endothelinteraktionen nachgewiesen. Durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (darunter ICAM-1, P-Selektin und E-Selektin) auf der Oberfläche der Endothelzellen kommt es zu einer Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel. Man unterscheidet mehrere Schritte. Als Margination wird der Vorgang bezeichnet, bei dem die Leukozyten den Zentralstrom einer postkapillären Venole verlassen. Vermittelt durch Selektin-Rezeptoren folgt das Rollen der Zellen entlang der Gefäßwand, eine intermittierende Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel. Durch die verringerte Distanz zwischen Endothelzelle und Leukozyt können nun Mediatoren, darunter Platelet-activating factor (PAF), Interleukin 8, Leukotrien B4 und Bradykinin, zu einer Aktivierung der Zellen führen [1, 27, 58, 198]. Daraus resultiert eine Konformationsveränderung von Membranmolekülen, den Integrinen, auf den Leukozyten, die eine Interaktion mit Rezeptoren auf der Endothelzelle eingehen und zu einer festen Bindung der Leukozyten am Endothel führen können. In der Folge kommt es zur Extravasation der Zellen in das perivaskuläre Parenchym, wo sie zur Bildung toxischer Mediatoren und zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes beitragen [30, 87].

Neben der Aktivierung von Leukozyten gibt es zunehmend Hinweise auf eine Rolle der Thrombozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Dabei kommt es, wie bei den Leukozyten, zu Interaktionen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen. Auch hier vermitteln endotheliale Selektin-Rezeptoren (v.a. P-Selectin) zuerst ein Rollen der Thrombozyten entlang der Gefäßwand mit darauf folgender Aktivierung und Adhärenz [38, 70, 98]. Aktivierte Thrombozyten tragen zur Bildung

von reaktiven Sauerstoffspezies, Eikosanoiden, Chemokinen und Wachstumsfaktoren bei, wodurch auch sie eine Gewebsschädigung hervorrufen [21, 37, 128, 156, 187].

Unter experimentellen Bedingungen konnte durch eine Hemmung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen durch Antikörper oder pharmakologische Inhibitoren bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. Ischämie oder Trauma, und verschiedenen Organsystem eine Protektion erzielt werden [15, 22, 52, 88, 89, 112, 124, 139, 146, 147, 157, 162]. Diese Mechanismen stellen also viel versprechende Möglichkeiten zur Therapie verschiedener Krankheitsbilder dar.

Aufgrund der großen Heterogenität des Gefäßendothels abhängig von Gefäßtyp, Organ und Spezies sind Ergebnisse, die in einem Bereich erzielt wurden, nicht auf einen anderen übertragbar. Viele der erwähnten Mechanismen der Leukozyten-Endothelinteraktionen sind in der zerebralen Mikrozirkulation bestätigt worden. So wurde eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel des Gehirns histologisch nachgewiesen [170, 196]. Welche Adhäsionsmoleküle und Mediatoren in vivo beteiligt sind, ist bisher jedoch nicht geklärt. Auch bezüglich der Thrombozyten-Endothelinteraktion in der zerebralen Mikrozirkulation gibt es bisher nur wenige Daten. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Untersuchung der einzelnen Mediatoren zu. Diese spielen beim Ablauf einer Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle, da häufig durch einen einzelnen Mediator eine Vielzahl an Prozessen in Gang gesetzt wird. Hierzu gehört u.a. das Bradykinin, eine Substanz, die zum Kallikrein-Kinin System gehört.

1.3 Das Kallikrein-Kinin System und seine Bedeutung für den ischämischen Sekundärschaden

Das Kallikrein-Kinin System besteht unter anderem aus den Kininen, den aktiven Metaboliten dieses Systems, die aus natürlich vorkommenden Proteinen, den Kininogenen, enzymatisch freigesetzt werden. Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems läuft in mehreren Schritten ab. Eine Aktivierung von Hageman Faktor (Faktor XII des plasmatischen Gerinnungssystems) durch Kontakt von Blut mit negativ geladenen Oberflächen führt zur Aktivierung des Enzyms Kallikrein durch Spaltung des inaktiven Proenzym Präkallikrein. Man unterscheidet ein in der Leber gebildetes plasmatisches (p) Kallikrein von verschiedenen im Gewebe vorkommenden (tissue, t) Kallikreinen. Kallikrein führt zur Spaltung der inaktiven Vorstufen der Kinine, den Kininogenen, wodurch die Kinine freigesetzt werden. Das Nonapeptid Bradykinin wird dabei durch p-Kallikrein aus High Molecular Weight Kininogen (HMWK) freigesetzt, das Dekapeptid Kallidin durch t-Kallikrein aus Low Molecular Weight Kininogen (LMWK) (siehe Abbildung 1). Die Kinine wirken an zwei verschiedenen Rezeptoren, dem Kinin B₁ Rezeptor und dem Kinin B₂ Rezeptor. Bradykinin und Kallidin sind die Hauptagonisten am Kinin B₂ Rezeptor. Zahlreiche Peptidasen, darunter Angiotensin Converting Enzyme, Kininasen I und II,

führen zu einer enzymatischen Spaltung der Kinine. Daraus resultieren meist inaktive Peptide. Eine Spaltung durch Kininase I führt zum Verlust des C-terminalen Arginins der Kinine. Es entstehen des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg⁹-Kallidin, die beiden Hauptagonisten am Kinin B₁ Rezeptor [7, 141].

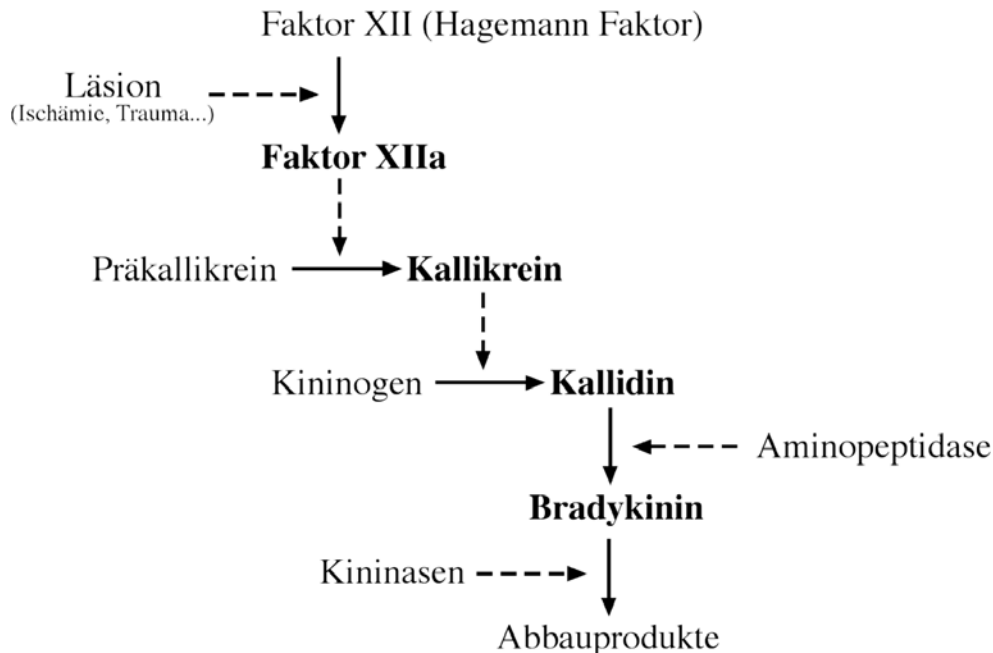


Abbildung 1: Schema zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems und Freisetzung von Bradykinin. Kommt es in einem Organ, durch eine Läsion verursacht, zu einer Aktivierung von Hagemann Faktor (Faktor XII), aktiviert dieser wiederum Präkallikrein. Das entstandene Kallikrein spaltet nun Kininogen, wodurch Kallidin freigesetzt wird. Durch eine enzymatische Spaltung von Kallidin durch Aminopeptidasen entsteht Bradykinin, welches durch verschiedene Kininasen weiter gespalten werden kann. (Durchgezogene Linien: Freisetzung einer Substanz aus der Vorstufe; gestrichelte Linien: Enzym, welches zu einer Spaltung führt).

Im zentralen Nervensystem verschiedener Spezies konnte sowohl die Existenz der verschiedenen Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems als auch deren Rolle bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen nachgewiesen werden [137]. Kinine sind an der Eröffnung der Blut-Hirnschranke und der Ödembildung nach Trauma und Ischämie beteiligt [66, 169, 182, 183]. Lehmberg et al. konnten zeigen, dass eine Antagonisierung der Kinin Rezeptoren nach globaler zerebraler Ischämie zu einer Reduktion der Leukozyten-Endothelinteraktionen führt [90]. Auch in anderen Organsystem, wie zum Beispiel dem Pankreas von Ratten oder der Haut von Mäusen gibt es Hinweise für eine Rolle des Kallikrein-Kinin Systems bei der Aktivierung von Leukozyten [1, 56]. Shigematsu et al. konnten zeigen, dass im Mesenterium der Ratte die lokale Applikation von Bradykinin zu einer konzentrationsabhängigen Initiierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen führt [161]. Ob dies auch für die zerebrale Mikrozirkulation gilt ist bisher unklar. Ebenfalls nicht geklärt ist ein möglicher Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems auf Thrombozyten-Endothelinteraktionen.

Durch Hemmung des Kallikrein-Kinin Systems durch Kinin B₂ Rezeptor-Antagonisten bei zerebraler Ischämie konnte eine Reduktion des sekundären Hirnschadens erzielt werden [99, 145]. Diese Daten sprechen für eine zentrale Rolle des Kallikrein-Kinin Systems bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens. Die Detailmechanismen sind dabei weitgehend unbekannt, deren Verständnis ist für eine zielgerichtete Therapie jedoch unbedingt nötig.

1.4 Fragestellung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation unter besonderer Berücksichtigung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktion im experimentellen Tiermodell zu untersuchen. Mittels intravitalmikroskopischer Techniken sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Führt Bradykinin zu Veränderungen in der zerebralen Mikrozirkulation mit Veränderungen der regionalen Perfusion, der funktionellen Kapillardichte, der Gefäßdurchmesser und der Gefäßpermeabilität?
2. Kommt es durch Bradykinin zur Auslösung von Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der zerebralen Mikrozirkulation?
3. Findet sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung und
4. können die Bradykinin-induzierten Effekte durch die Gabe spezifischer Kinin-Rezeptorantagonisten gehemmt werden?

2 Methodik

Die Untersuchungen wurden von 2001 bis 2004 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. A. Baethmann) mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben AZ. 211-2531-16/98) durchgeführt.

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 96 männlichen Gerbils – mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*). Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gezüchtet (Stammzucht der Firma Janvier Elevage, Le Genest – St-Isle, Frankreich). Die Haltung der Wüstenrennmäuse erfolgte in Macrolonkäfigen Typ 3 bei 22°C Raumtemperatur, 60 % Luftfeuchtigkeit und einem kunstlichtgesteuerten zwölf Stunden Tag/Nachtzyklus. Zur Versorgung standen beliebig Trinkwasser und 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) zur Verfügung. Bei Durchführung der Versuche hatten die Tiere ein Mindestalter von 12 Wochen und ein Körpergewicht von 65 – 75g.

2.2 Experimentelles Modell

2.2.1 Anästhesie

Die Narkose der Versuchstiere wurde mit den Inhalationsanästhetika Halothan (Halocarbon Laboratories, River Edge, New Jersey, USA) und Lachgas durchgeführt. Das verwendete Gasgemisch bestand aus Lachgas mit Anreicherung von 27% Volumenanteil Sauerstoff und Halothan. Der inspiratorische Sauerstoffgehalt wurde oximetrisch (Oxidig, Drägerwerke AG, Lübeck) kontrolliert. Ein abgeschnittener und gepolsterter Spritzenkopf (20 ml Spritze, Braun Melsungen AG, Melsungen) wurde über die Schnauze der Versuchstiere gesetzt. Zwei in den Spritzenkopf eingepasste Gummischläuche dienten zur Einleitung und Absaugung des Narkosegases, das zugeführte Volumen des Gasgemisches betrug dabei 0,5 l/min. Durch die während des gesamten Versuchsablaufs bestehende Spontanatmung der Versuchstiere war eine Intubation unnötig.

Der Volumenanteil von Halothan im Gasgemisch wurde während der Einleitung auf 4%, für den Zeitraum der chirurgischen Präparation auf 1,5% und während der Intravitalmikroskopie auf 0,6 – 0,8% eingestellt. Dadurch wurde zu jedem Zeitpunkt eine ausreichend tiefe Narkose und eine konstant stabiler mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) erreicht.

2.2.2 Temperatur

Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde durch eine untergelegte Heizplatte (Effenberger, Pfaffing) bei 37°C konstant gehalten, wobei die Temperatur über eine rektale Temperatursonde automatisch geregelt wurde. Die Kalotte und das kranielle Schädelfenster wurden mit einer auf 37°C erwärmten Kochsalzlösung superfundiert, um eine lokale Hypothermie zu verhindern.

2.2.3 Chirurgische Präparation

2.2.3.1 Arterieller und venöser Katheter

Die kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte über einen Kunststoffkatheter in der linken A. femoralis. Der Katheter hatte einen Außendurchmesser von 0,61 mm und einen Innendurchmesser von 0,28 mm (Fa. Portex, Hythe, England). Durch eine Perfusorpumpe (Perfusor segura, B. Braun, Melsungen) wurde der Katheter kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung (0,2 ml/h, Fresenius, Bad Homburg) gespült. An den Katheter war ein Druck-Transducer (DTX Plus, Fa. Spectramed, Düsseldorf) angeschlossen, welcher zur Erfassung des arteriellen Blutdrucks mit einem Messaufnahmesystem (Plugsys System, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) verbunden war. Die Daten wurden für die gesamte Versuchsdauer durch einen Computer mit Hilfe der Software DASYLab (DASYLab V 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchenglattbach) erfasst und aufgezeichnet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe und Inhibitoren wurden über einen venösen Zugang infundiert. Zu diesem Zweck wurde ein Kunststoffkatheter (Dimensionen s.o., Fa. Portex, Hythe, England) in die linke V. femoralis eingesetzt.

2.2.3.2 Karotiskatheter

Ein weiterer Kunststoffkatheter (Dimensionen s.o., Fa. Portex, Hythe, England) wurde, um die lokale Infusion von Bradykinin in die A. carotis interna zu ermöglichen, in die A. carotis externa implantiert. Zu diesem Zweck wurde die Haut zwischen Unterkiefer und Unterhautfettgewebe mobilisiert. Daraufhin wurden die linke A. carotis communis in ihrem Verlauf entlang der Trachea bis zur Bifurkation und der proximale Anteil der A. carotis interna und externa dargestellt. Nach Abklemmung der A. carotis externa an der Bifurkation wurde diese mobilisiert und ca. 2 mm distal der Bifurkation durchtrennt. In dem so entstandenen Gefäßstumpf wurde der Katheter fixiert. Danach wurde die Gefäßklemme entfernt und die Katheterspitze bis zur Bifurkation vorgeschoben. Dabei wurde genau darauf geachtet, dass die Katheterspitze nicht in das Gefäßlumen der A. carotis communis oder der A. carotis interna hineinragt. Durch eine weitere Perfusorpumpe (SP100i Syringe Pump, World Precision In-

struments Inc, Sarasota, USA) wurde auch dieser Katheter fortlaufend mit isotoner Kochsalzlösung (0,1 ml/h, Fresenius, Bad Homburg) gespült.

Während der gesamten Präparation wurde besonders auf die Schonung der umliegenden Strukturen, wie z.B. den Truncus vagosympathicus und den N. phrenicus, und eine kontinuierliche Durchblutung der A. carotis interna geachtet.

2.2.3.3 *Transdurales Schädelfenster*

Bei der Durchführung der bisher beschriebenen Präparationsschritte befand sich das Versuchstier in Rückenlage. Zur Anlage des transduralen Schädelfensters wurde das Tier in Bauchlage in eine stereotaktische Halterung (Mod. 51600, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) eingespannt. Die Galea der parietalen Kalotte wurde über eine Länge von ca. 2,5 cm aufgeschnitten und die Hautränder mit Seidenfäden (Stärke 3 – 0, Fa. Ethicon, Nordersted) zur Seite gezogen. Nach Lösung des Periosts von der linken parietalen Kalotte, wurde in diesem Areal die Schädeldecke mit einem elektrischen Bohrer (Rewatronik, München), in dessen Bohrfutter ein Rosenbohrer (Durchmesser der Spitze 0,6 mm, Fa. Aesculap, Tuttlingen) eingespannt war, unter kontinuierlicher Kühlung rechteckig bis auf die Lamina interna abgefräst. Hierdurch entstand ein 5 x 5 mm messender Knochendeckel, welcher vorsichtig mit einer Pinzette von der Dura mater abgehoben wurde. Bei Verletzungen der Dura mater wurde das Tier vom Versuch ausgeschlossen. Anschließend wurden die Hautfäden über ein Widerlager gespannt und der dadurch entstandene Trichter von ca. 1 cm Höhe mit Kochsalz gefüllt.

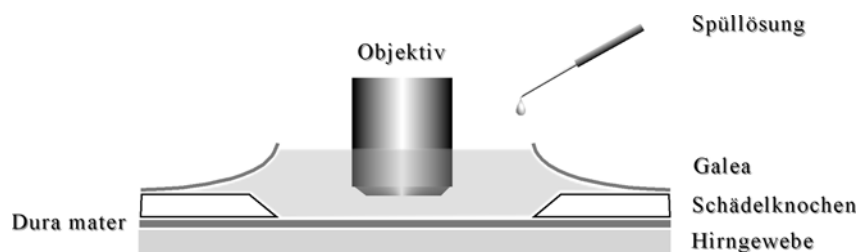


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Schädelfensters mit geschlossener Dura mater in Seitenansicht.

2.2.4 **Laserdoppler-Fluxmetrie**

Die mikrovaskuläre Perfusion wurde mit dem Laser-Doppler Flowmeter PeriFlux 4001 Master (Perimed, Stockholm, Schweden) bestimmt. Die Wellenlänge des von einer Halbleiterlaserdiode erzeugten monochromatischen, kohärenten Lichts betrug 770 – 790 nm. Durch eine Glasfaseroptik (Fiberoptik-Sonde, Probe 4/5 – 2/0, Perimed, Stockholm, Schweden) wurde das Laserlicht zum Gewebe und das reflektierte Streulicht zum Photodetektor geleitet, welcher aus den Photonen ein elektrisches Signal produziert. Mit Hilfe jeweils einer Messsonde auf der parietalen Kalotte beidseits wurde der kortikale Flux beider Hemisphären während der gesamten Dauer der intravitalmikroskopischen Untersu-

chungen ermittelt und entsprechend den Blutdruckwerten über das Messaufnahmesystem am Computer aufgezeichnet.

2.2.5 Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe

2.2.5.1 Kontrastverstärkung des Plasmas

Die Darstellung der pialen Gefäße unter dem Mikroskop wurde durch die intravenöse Injektion von 0,3 ml einer 0,5% Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red Dextran mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton erreicht (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Die Applikation des Farbstoffs erfolgte einmal zu Beginn des Untersuchungszeitraums als Bolus.

2.2.5.2 In vivo Markierung der Leukozyten

Um die Leukozyten in der pialen Mikrozirkulation darzustellen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, Molekulargewicht: 497,02, Merck, Darmstadt) intravenös injiziert. Dieser Farbstoff gelangt in die Zellen, wo er in Abhängigkeit vom Membranpotential in den Mitochondrien akkumuliert (Horobin et al. 1990 und Rashid et al. 1990). Während des gesamten Versuchs wurde 1 ml einer 0,02% Lösung verabreicht. Die Gabe des Farbstoffs erfolgte als Bolus zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen und zusätzlich jeweils zur Bestimmung der arterio-venösen Transitzeit.

2.2.5.3 In vitro Markierung der Thrombozyten

Zur Isolation und Färbung der Thrombozyten in vitro wurden 1,5 ml Vollblut durch Herzpunktion eines syngeneten Spendertieres gewonnen. Das Blut wurde auf zwei Polypropylen-Röhrchen (10 ml, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) mit jeweils 0,4 ml eines ACD-Stabilisators (ACD-Stabilisator nach U.S.P. Form B: 23 mM Zitronensäure, 53 mM Trinatriumzitat, 74 mM Glukose), 20 µl Prostaglandin E₁ (PGE₁, Serva, Heidelberg) und 0,5 ml D-PBS (Dulbecco phosphate buffered saline, Pan Systems, Aidenbach) verteilt. Das Blut wurde im Anschluss für 10 min bei 130 g zentrifugiert. Daraufhin wurde das thrombozytenreiche Plasma aus den beiden Polypropylen-Röhrchen in jeweils ein neues Röhrchen mit 0,6 ml des ACD-Stabilisators, 40 µl PGE₁ (Serva, Heidelberg) und 1 ml D-PBS (Pan Systems, Aidenbach) gegeben. Nach Hinzufügung des Fluoreszenzfarbstoffes CFDA-SE (aminoreactive succinimidylester carboxyfluorescein-diacetat, Molecular Probes, Eugene, OR) wurde das thrombozytenreiche Plasma bei 1430 g für weitere 10 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 0,5 ml D-PBS (Pan Systems, Aidenbach) aufgelöst. Anschließend wurden die Konzentration der Thrombozyten und die Reinheit der Suspension durch den Coulter A^cT

Counter (Coulter, Miami, Florida, USA) untersucht. Vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden dem Versuchstier 200×10^6 fluoreszenzmarkierte Thrombozyten intravenös injiziert.

2.2.5.3.1 Kontrolle der Thrombozytenfunktion in vitro

Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde in vitro durch die Durchflusszytometrie überprüft. Dazu wurden mit dem Durchflusszytometer FACSort (Becton Dickinson, Heidelberg) wiederholt Messungen der Thrombozytensuspension unterschiedlicher Spendertiere durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach Isolation der Thrombozyten im Vergleich zu Thrombozyten im Vollblut und nach Stimulation der Thrombozytensuspension mit ADP (200 μ M, Sigma, Deisenhofen) und Thrombin (human thrombin, 1 U/ml, Sigma, Deisenhofen).

2.2.5.3.2 Kontrolle der Thrombozytenfunktion in vivo

Die Untersuchung der Thrombozytenfunktion in vivo erfolgte bei vier Versuchstieren mit Hilfe der Intravitalmikroskopie. Bei der Präparation dieser Tiere wurde auf die Anlage eines Karotiskatheters verzichtet, der Versuchsaufbau war identisch mit den Untersuchungen nach Bradykinin-Infusion (siehe unten). Zur Initiierung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen wurde das Prinzip der Photothrombose angewandt. Dazu wurde zu Beginn der Intravitalmikroskopie der Farbstoff Photosan (2mg/kg KG, Haematoporphyrin-Equivalent, Seehof-Laboratorium, Wesselburenerkoog) intravenös verabreicht. Es folgte darauf die Untersuchung verschiedener arteriöler und venöler Gefäßabschnitte von 100 μ m Länge. Insgesamt wurden 14 Arteriolen und 16 Venolen untersucht. Nach Aufzeichnung des Gefäßdurchmessers mit dem TX-2-Filterblock folgte eine kontinuierliche Beleuchtung und gleichzeitige Aufnahme des jeweiligen Gefäßsegments mit dem L3-Filterblock über 8 Minuten. Die Videoaufnahmen wurden zu einem späteren Zeitpunkt offline ausgewertet, wobei die Anzahl der rollenden und adhärenen Thrombozyten über einen Zeitraum von 30 Sekunden 0, 2, 4 und 6 Minuten nach Beginn der Beleuchtung ermittelt wurde.

2.2.5.4 Kontrolle der Blut-Hirnschranke

Zur Untersuchung der Integrität der Blut-Hirnschranke wurden am Ende des Akutversuchs 0,3 ml einer 0,2 % Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Na^+ -Fluoreszein ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$, Molekulargewicht: 332,31) intravenös injiziert. Im Anschluss an die Injektion des Farbstoffes und 20 min danach wurde eine intravitalmikroskopische Aufnahme angefertigt. Bei Schädigung der Blut-Hirnschranke tritt der Farbstoff aus den Blutgefäßen aus und färbt das Hirnparenchym an.

Farbstoff	Markierung	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum
Texas Red Dextran	Plasma	595 nm	615 nm
Rhodamin 6G	Leukozyten	528 nm	551 nm
CFSE	Thrombozyten	494 nm	518 nm
Na ⁺ -Fluoreszein	Blut-Hirnschranken- Integrität	494 nm	520 nm

Tabelle 1: *In der Intravitalmikroskopie eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe, deren Exzitations- und Emissionsmaximum und die durch den jeweiligen Farbstoff markierte Struktur.*

2.2.6 Bestimmung des kleinen Blutbildes

Vor und nach Injektion der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten in das Versuchstier und am Ende des gesamten Versuchs wurden jeweils bei dem Versuchstier über den arteriellen Katheter 50 µl Vollblut in heparinisierte Röhrchen (MultiCap, Bayer, 473823, 60 µl, 130 – 200 I.E./mL Na/Li/Ca Heparin titriert mit KCl) entnommen. Es folgte die Bestimmung des kleinen Blutbildes der Proben durch einen Coulter A^CT Counter (Coulter, Miami, FL). Folgende Parameter wurden dabei ermittelt:

- Anzahl der Leukozyten
- Anzahl der Thrombozyten
- Hämoglobin

2.2.7 Intravitalmikroskopie

2.2.7.1 Aufbau des Intravitalmikroskops

Der Arbeitsplatz der Intravitalmikroskopie bestand aus einem Orthoplan-Epiilluminationmikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar), welches auf einer 300 kg schweren Granitplatte montiert war. Die gesamte Einheit stand auf einem Metallunterbau mit pneumatischen Füßen. Die stereotaktische Halterung mit dem Versuchstier wurde auf einem Tisch mit Kugelgelenk fixiert, wodurch die Orientierung des Mikroskopieareals ermöglicht wurde. Der Kipptisch war auf einem Kreuztisch (Fa. Leitz, München) montiert, welcher durch einen elektrisch steuerbaren Schrittmotor (IXEC, Phytron, Gröbenzell) Bewegungen auf horizontaler Ebene in 25 µm Intervallen ermöglichte. Dadurch konnten pro Versuch mehrere regions of interest (ROI) ausgewählt und nach Protokollierung der x-y-Koordinaten zu den verschiedenen Messzeitpunkten exakt wieder angesteuert und analysiert werden. Eine 75 Watt Xenon-Gasentladungslampe (XBO 75 W/2, Fa. Leitz, München) wurde als Anregungslichtquelle eingesetzt. Das Licht durchlief zuerst ein 7 mm dickes Hitzefilter (Fa. Leitz, München) und eine variable Irisblende, daraufhin wurde es durch eine Filterkombination gelenkt. Der Einsatz der

Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung Ploemopak (Fa. Leica, Wetzlar) ermöglichte dabei den wechselnden Einsatz verschiedener Filterkombinationen durch eine Schnellschaltvorrichtung. Diese Filterkombinationen waren in austauschbaren Filterblöcken untergebracht und bestanden aus einem jeweils aufeinander abgestimmten Anregungs-, Reflexions-Kurzpass- und Sperrfilter. Dadurch war die separate Darstellung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbter Strukturen möglich.

Filterblock	Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
L3	CFSE Na ⁺ -Fluoreszein	BP 450 – 490 nm	RKP 510 nm	BP 525/20 nm
N3	Rhodamine 6G	BP 546/12 nm	RKP 565 nm	BP 600/40
TX 2	Texas Red Dextran	BP 560/40 nm	RKP 595 nm	BP 645/75

Tabelle 2: *Spektren der Ploemopak-Auflichtilluminatoren. BP: Bandpassfilter, RKP: Reflexions-Kurzpaßfilter.*

Durch verschiedene Objektive (Salzwasser-Immersionsobjektiv 25x 0,6 numerische Apertur oder Objektiv 10x 0,22 numerische Apertur, Leitz GmbH, Wetzlar) wurde das Licht auf die Präparation geleitet. Das 25x Objektiv wurde zur Untersuchung der Mikrozirkulation verwendet, zur Überprüfung der Blut-Hirnschrankenintegrität das 10x Objektiv. Dabei wirkte das jeweilige Objektiv gleichzeitig als Kondensator, in dem es das durch die Anregung emittierte Fluoreszenzlicht zum Reflexions-Kurzpaßfilter übertrug. An diesem wurde es aufgrund seiner größeren Wellenlänge abgelenkt und gelangte über den Sperrfilter und einen weiteren Spiegel zum Okular (Periplan 10x, Leitz GmbH, Wetzlar) oder über einen C-Mount-Adapter zu einer Videokamera. Bei der Videokamera handelte es sich um eine hochauflösende Silizium Intensified Target (SIT) Restlichtkamera (C2400-08, Fa. Hamamatsu Photonics, Herrsching) mit einer Sensitivität von 50 $\mu\text{A}/\mu\text{W}$ im Wellenlängenbereich von 400 – 650 nm. Die generierten Videosignale wurden durch einen Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München) mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde auf S-VHS Videobändern (H471S, SVHS, SE 180, Fuji Photo Film Co., LTD. Tokyo, Japan) aufgenommen, über einen Videozeitgenerator (VTG-33, FOR-A-Company Ltd., Japan) wurden zusätzlich das Datum und die Uhrzeit (2/100 sec.-Schritte) eingespielt. Die Betrachtung der Versuchsszenen in Echtzeit wurde in 930-facher Vergrößerung durch einen Trinitron Farbmonitor (PVM-2730 QM, Sony, Köln) ermöglicht.

2.2.7.2 Mikroskopieareal

Nach Abschluss der chirurgischen Präparation wurde das Versuchstier unter dem Intravitalmikroskop positioniert und das transdurale Schädelfenster in der horizontalen Ebene ausgerichtet. Danach wurden mit dem 10x Objektiv geeignete Bereiche der parietalen Hirnrinde für die Intravitalmikroskopie ermittelt. Besonders wurde darauf Wert gelegt, dass die pialen Gefäße nicht von größeren Gefäßen der Dura

mater überdeckt wurden und die zu untersuchenden Gefäße in einer Fokusebene lagen. Anschließend wurden mit dem 25x Objektiv die verschiedenen ROIs ausgewählt und deren Koordinaten protokolliert. Bei den Versuchstieren wurden jeweils zwei Gebiete mit einer Arteriole und einer Venole in Nachbarschaft zueinander, zwei Gebiete mit einer Arteriole, zwei Gebiete mit einer Venole und zwei Gebiete mit vorwiegend kapillären Gefäßen untersucht. Die ROIs mit den Arteriolen und den Venolen wurden jeweils 10 Sekunden mit dem TX-2-, 30 Sekunden mit dem N3- und 30 Sekunden mit dem L3-Filterblock aufgezeichnet, die ROIs mit den kapillären Gefäßen wurden 10 Sekunden mit dem TX-2- und 30 Sekunden mit dem N3-Filterblock aufgezeichnet.

2.2.7.3 Quantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die auf Videoband aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Versuchsszenen wurden nach dem Versuch quantitativ ausgewertet. Die folgenden Parameter wurden dabei untersucht:

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

Die Wiedergabe der Versuchsszenen erfolgte über einen Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München) auf einem Videomonitor (Sony Trinitron PVM-2130QM, Köln), an welchem die Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen ermittelt wurden. Durch eine an den Videorekorder angeschlossene Videokarte (PXC 200 Frame Grabber, Imagenation Corporation, Portland, Oregon, USA) konnten einzelne Bilder digitalisiert werden. In den digitalisierten Bildern wurden die Gefäßdurchmesser und die Kapillardichte mit der Bildverarbeitungssoftware CapImage (Version 7.3, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) bestimmt. Dabei lag bei dem verwendeten Computersystem mit 19 Zoll CRT-Monitor (N110S, Auflösung: 1024x768 pixel, V7 Videoseven, Ingram Micro Distribution GmbH, Heisenbergbogen, Dormach) eine 630-fache Vergrößerung vor.

2.2.7.3.1 Gefäßdurchmesser

Die arteriolären und venolären Gefäßdurchmesser wurden in den digitalisierten Videobildern mit der Software CapImage (Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) bestimmt. Es wurden dafür Versuchsszenen mit dem TX-2-Filterblock ausgewählt. Der Wechsel von hellem, mit Texas Red Dextran gefärbtem Plasma zum ungefärbten Endothel galt als Gefäßgrenze. Zur Messung des Durchmessers wurde zuerst ein Punkt am Rand des zu messenden Gefäßes mit dem Cursor markiert, darauf wurde ein zweiter Punkt möglichst senkrecht zum Gefäßverlauf am gegenüberliegenden Gefäßrand markiert. Das Bildverarbeitungsprogramm summiert daraufhin die Anzahl der Pixel zwischen beiden Punkten und ermit-

telt die dazwischen liegende Strecke. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und der Mittelwert der Messungen wurde als Durchmesser [μm] dokumentiert. Es wurde besonders Wert darauf gelegt, dass die Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten immer an denselben Gefäßsegmenten durchgeführt wurden.

2.2.7.3.2 *Kapillardichte*

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurden Videobilder untersucht, die mit dem N3-Filterblock aufgezeichnet wurden. Die Messung erfolgte nach Kontrastierung der Gefäße mit Rhodamin 6G. Dabei wurde davon ausgegangen, dass nur perfundierte Kapillaren durch die Rhodamin-Injektion dargestellt wurden. Kapillaren, die z.B. durch einen Leukozyten verlegt waren, wurden nicht durch das Kontrastmittel abgebildet. Nach Digitalisierung der Videobilder wurden die Kapillaren im Bildverarbeitungsprogramm per Hand in einem Areal von $0,072802 \text{ mm}^2$ nachgezeichnet, woraus die Software die Länge der Kapillardichte pro Fläche [cm^{-1}] errechnete.

2.2.7.3.3 *Rollen von Leukozyten und Thrombozyten*

Die Auswertung der rollenden Leukozyten und Thrombozyten in postkapillären Venolen erfolgte quantitativ am Videomonitor. Die Anzahl der rollenden Zellen wurde dabei in einem Gefäßabschnitt von $100 \mu\text{m}$ Länge und über 30 Sekunden als $n \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ protokolliert. Als Kriterien für das Rollen der Zellen galten folgende Definitionen: Ein rollender Leukozyt oder Thrombozyt hat Kontakt mit der Gefäßwand. Die Geschwindigkeit eines rollenden Leukozyten oder Thrombozyten ist im Vergleich zur Geschwindigkeit des Zentralstroms deutlich reduziert. Ein rollender Leukozyt oder Thrombozyt dreht sich um die eigene Achse.

2.2.7.3.4 *Adhärenz von Leukozyten und Thrombozyten*

Analog zur Anzahl rollender Leukozyten und Thrombozyten wurde auch die Anzahl adhärenter Leukozyten und Thrombozyten in postkapillären Venolen bestimmt. Dabei galt als Kriterium, dass eine Zelle mindestens 20 Sekunden an der Gefäßwand haften musste, ohne sich zu bewegen. Die Auszählung erfolgte in demselben Gefäßabschnitt wie bei den rollenden Leukozyten und Thrombozyten über einen Zeitraum von 30 Sekunden. Die Ergebnisse werden als $n \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ wiedergegeben.

2.2.7.3.5 *Arterio-venöse Transitzeit*

In Ergänzung zur Laserdoppler-Fluxmetrie wurde die arterio-venöse Transitzeit zur Bestimmung der mikrovaskulären Durchblutung herangezogen. Diese Methode ermöglicht die lokale Untersuchung der

Durchblutung in den Arealen der Intravitalmikroskopie. Dabei ist die Zeit, die ein intravenös verabreichter Indikator benötigt, um vom arteriellen in den venösen Gefäßabschnitt zu gelangen, die arterio-venöse Transitzeit (AVTT). Diese ist umgekehrt proportional zur Durchblutung und kann somit als Maß für die lokale Perfusion des Gewebes dienen.

$$\text{Durchblutung } Q = \frac{\text{Volumen } V}{\text{Zeit } t} \qquad \text{Durchblutung } Q = \frac{1}{AVTT}$$

Gleichung 1: Die regionale Durchblutung des Gewebes als Funktion der arterio-venösen Transitzeit (AVTT).

Bei der Durchführung der Versuche wurde ein Bolus von 30 µl Rhodamin 6G (Konzentration s.o) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten in die V. femoralis injiziert und eine intravitalmikroskopische Aufnahme eines Areals mit einer Arteriole und einer Venole während des gesamten Zeitraums von Anfluten bis Auswaschen des Indikators in Arteriole und Venole angefertigt.

Die Videosequenzen wurden nach dem Versuch mit einem Computer digitalisiert und mit Hilfe der Bildanalysesoftware KS400 (Carl Zeiss AG, Göttingen) analysiert. Die Software untersuchte dabei über einen Zeitraum von 6 Sekunden der Videosequenz alle 273 Millisekunden ein Bild. Jeweils ein Messfenster mit einer Größe von 40 x 40 Pixel wurde über die Arteriole und die Venole gelegt. Die Software ermittelte darauf von jedem der insgesamt 22 Bilder die Indikatorintensität als mittleren Grauwert der Pixel in den Messfenstern. Die Ergebnisse wurden anschließend in Tabellenform ausgegeben. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Daten in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft, Seattle, USA) importiert, in welchem aus den Grauwerten die arterio-venöse Transitzeit berechnet wurde. Dies wurde durch eine spezielle Rechenmatrize, die pro Aufnahmesequenz ca. 800 Rechenschritte durchführte, bewerkstelligt. Die einzelnen Rechenschritte basieren auf der Integral-Differenz-Methode, die 1993 von Rovainen et al. vorgestellt wurde [150] und sind in Abb. 3 erklärt. Das Prinzip der Methode ist der Vergleich der zusätzlichen Verzögerung der Anflutung und der Auswaschung eines Farbstoffes in einer Vene zu einer gepaarten Arterie.

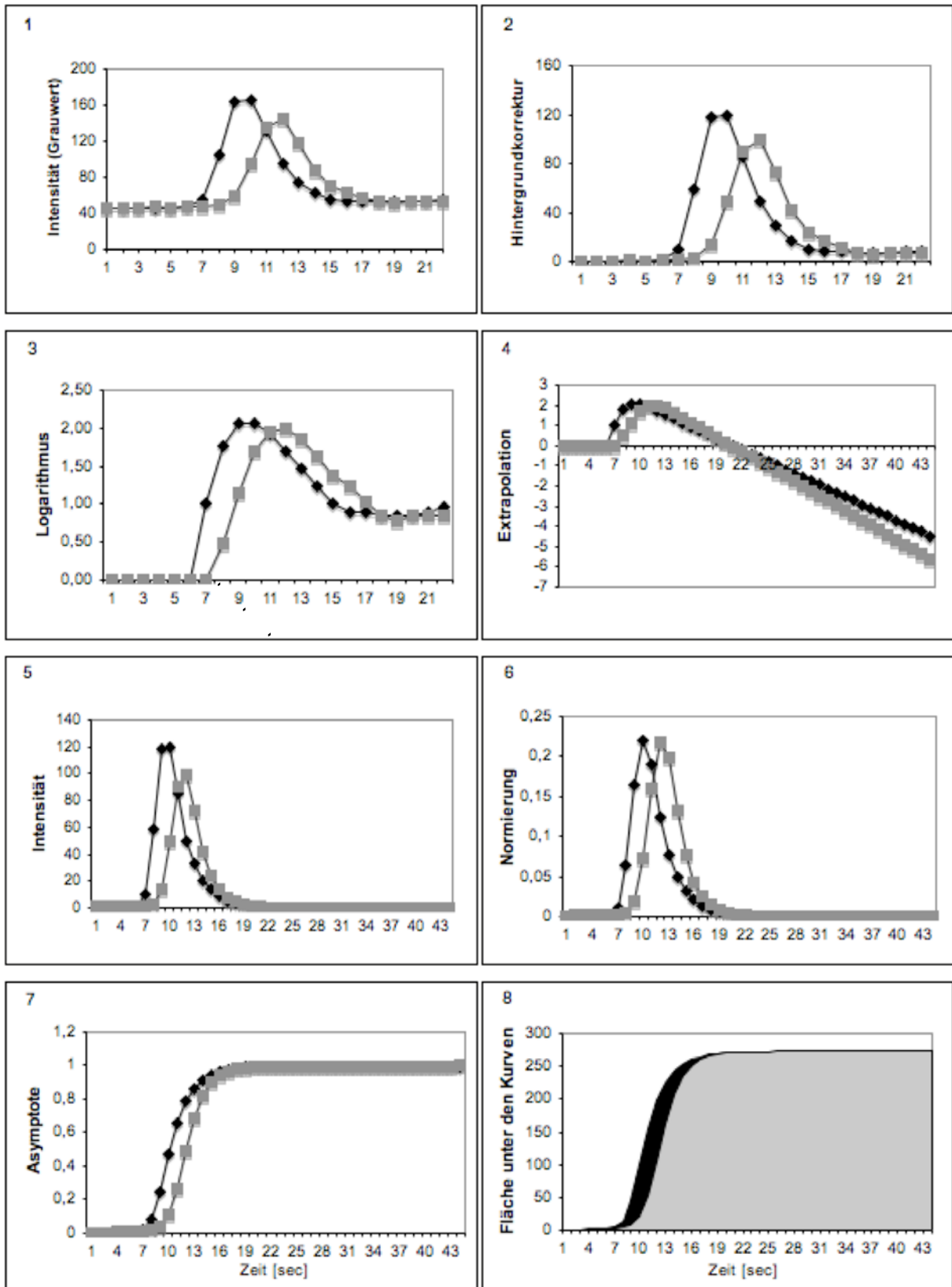


Abbildung 3: Schritte zur Berechnung der arterio-venösen Transitzeit (AVTT). Kurve 1 stellt die Rohwerte der Messung dar. Dabei entspricht jeder Punkt der Kurve dem mittleren Grauwert aller Pixel im Messbereich zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Werte der Arteriole sind schwarz dargestellt, die Werte der Venole grau. Die jeweiligen Werte entsprechen der Farbstoffintensität zu diesem Zeitpunkt. Kurve 2 zeigt die Werte nach Subtraktion der vor Bolusgabe bestimmten Fluoreszenzintensität, die dargestellten Werte entsprechen nur dem Anfluten und Auswaschen des Farbstoffbolus. In

dieser Kurve zeigt sich zunächst ein rascher Anstieg des mittleren Grauwertes, darauf fällt der Wert wieder ab, durch die Rezirkulation des Kontrastmittels wird jedoch der Abfall auf Ausgangswerte verhindert. Durch Logarithmieren (Kurve 3) ergibt sich ein Kurvenverlauf, der ohne Rezirkulation einen linearen Verlauf beim Abfall der Farbintensität zeigen würde. Aus dem linearen Anfangsteil dieses Abfalls der Farbintensität ist die Berechnung eines Verlaufs mit linearer Kinetik möglich (Kurve 4). Durch Delogarithmieren (Kurve 5) lässt sich eine Kinetik für Anfluten und asymptotischer, gegen Null strebender Auswaschung ohne Störung durch Rezirkulation darstellen. Durch Integration erhält man die Fläche unter der Kurve, darauf wird die Fläche für die Arteriole und die Venole in einer Normierung gleich 1 gesetzt (Kurve 6). Die Summierung der Teilflächen unter der Kurve ergibt den asymptotischen Verlauf der Flächenzunahme (Kurve 7). Eine Integration dieser Kurve ermöglicht die Berechnung der Fläche unter der Kurve mit der Dimension fraktionelle Änderung \times Sekunde. Zuletzt werden die Flächen für Arteriole und Venole von einander subtrahiert, man erhält die arteriovenöse Transitzeit.

2.2.8 Histologie

Die Aktivierung von Leukozyten wurde zusätzlich in Arealen, die der Intravitalmikroskopie nicht zugänglich sind, histologisch untersucht. Die Färbung der Hirnschnitte mit der Granulozyten-spezifischen Esterase ermöglichte dabei die selektive Darstellung und Quantifizierung von Granulozyten in tieferen Hirnschichten und nach Emigration in das Parenchym.

2.2.8.1 Fixation

Zur Vorbereitung der histologischen Untersuchung wurden die Versuchstiere bei Beendigung des Akutversuches mit 4% Phosphat-gepufferter (pH 7,4) Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert. Der Thorax der Versuchstiere, die sich weiterhin in Halothannarkose befanden, wurde zu diesem Zweck eröffnet, eine Kanüle (20 G) im linken Herzventrikel fixiert und der rechte Vorhof inzidiert. Zuerst wurde das Gefäßsystem mit physiologischer Kochsalzlösung und bei einem Druck von 120 cm H₂O gespült, bis das Effluat aus dem rechten Atrium klar war. Anschließend wurde die 4% Paraformaldehydlösung unter gleichem Druck über 15 min infundiert. Nach Entfernung der Kalotte wurden die Nervi olfactorii und optici durchtrennt, das Gehirn entnommen und in 4% Paraformaldehydlösung über 24 Stunden eingelegt. Anschließend wurde das Gehirn in eine mit Bleistift beschriftete Megakassette (Größe: 40 x 28 x 12 mm, medite GmbH, Burgdorf) gelegt, weitere 24 Stunden in 70% Ethanol eingelegt und zuletzt in 90% Ethanol aufbewahrt.

2.2.8.2 Präparatherstellung

Zur Einbettung der Gehirne wurden diese 24 h in 96% Ethanol, nachfolgend 9 h in 100% Ethanol und 17 h in Aceton eingelegt. Zuletzt wurden die Gehirne 30 h in Paraffin eingelegt und darauf in einer vorgewärmten Metallform mit Paraffin ausgegossen. Nach Erkalten des Paraffins wurde der entstan-

dene Paraffinblock für das Anfertigen der Schnitte vorbereitet. Es wurden im Abstand von 500 μm jeweils 16 Schnitte mit einer Dicke von 4 μm angefertigt.

Zur Darstellung der Granulozyten in den Schnitten wurden diese mit der Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase (Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase Kit, Fa. Sigma) angefärbt.

2.2.8.3 Auswertung der Histologie

Die Auswertung der Histologie erfolgte an einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen) mit einem 10x-Objektiv. Für jedes Versuchstier wurde ein Schnitt aus dem Bereich ca. 1,7 mm kaudal des Bregmas untersucht. Dabei wurde jeweils die Anzahl der positiv gefärbten Zellen in beiden Hemisphären ermittelt.

2.2.9 Versuchsprotokoll

Bei den durchgeführten Versuchen handelt es sich ausschließlich um Akutversuche. Nach Einleitung der Narkose und chirurgischer Präparation folgte die Untersuchung durch die Intravitalmikroskopie. Eine detaillierte Übersicht über den zeitlichen Ablauf und die einzelnen Messzeitpunkte bietet Abbildung 4. Am Ende der Intravitalmikroskopie wurden die Versuchstiere in Narkose für die Histologie perfusionsfixiert.

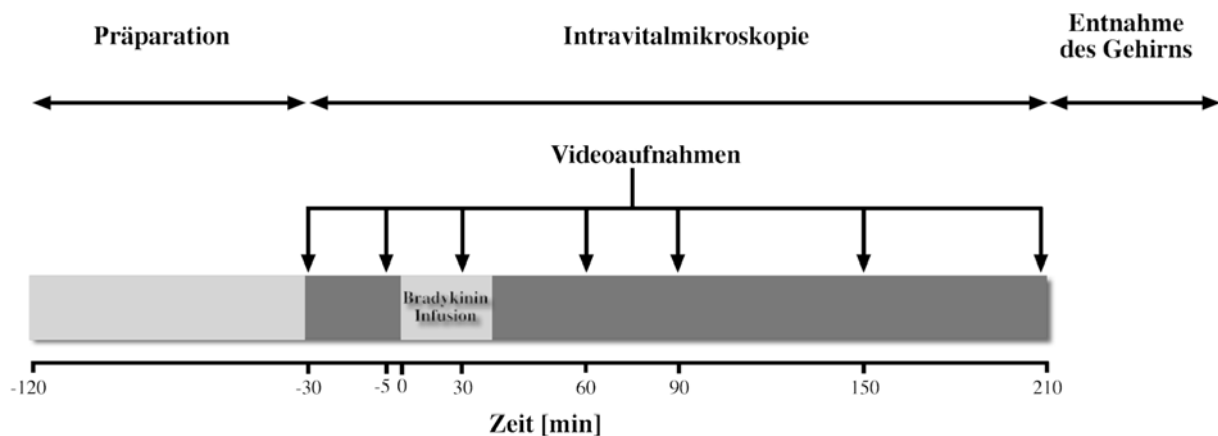


Abbildung 4: Versuchsprotokoll. Nach 90 minütiger Präparation wurde mit der Untersuchung der Mikrozirkulation begonnen. Dabei wurden insgesamt sieben verschiedenen Zeitpunkte für die Intravitalmikroskopie ausgewählt. Nach Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde das Versuchstier durch Perfusion fixiert und das Gehirn zur histologischen Aufbereitung entnommen. In der Abbildung wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten mit der Infusion von Bradykinin begonnen. Das Protokoll war für alle Versuchsgruppen identisch. Bei den Versuchsgruppen, die Kinin-Rezeptorantagonisten erhielten, erfolgte zusätzlich zum Zeitpunkt -30 Minuten bis zum Ende des Versuchs die Infusion des jeweiligen Antagonisten.

2.3 Bradykinin und Bradykinin-Antagonisten

2.3.1 Bradykinin

Bradykinin, das aktive Peptid des Kallikrein-Kinin Systems, besteht aus neun Aminosäuren (siehe Abbildung). Die molekulare Struktur setzt sich wie folgt zusammen: Arginin-Prolin-Prolin-Glycerin-Phenylalanin-Serin-Prolin-Phenylalanin-Arginin.

Zur Durchführung der vorgestellten Versuche wurde Bradykinin-Azetat (Sigma, Deisenhofen) entsprechend den gewünschten Konzentrationen mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt.

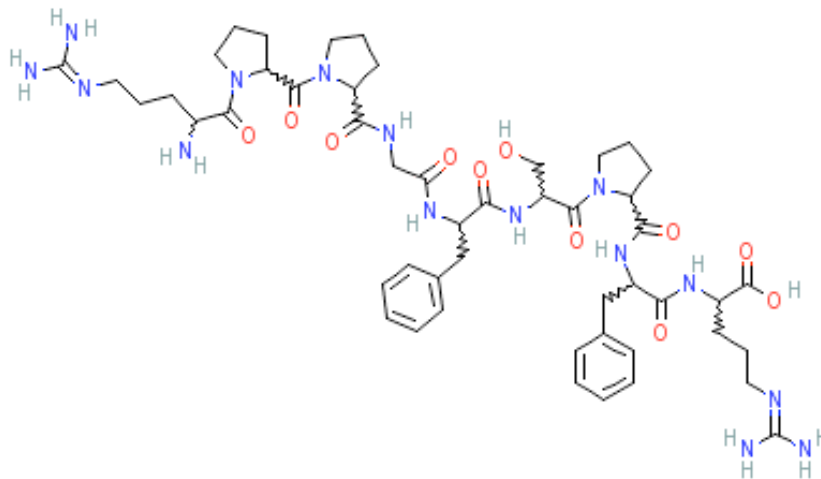


Abbildung 5: Strukturformel von Bradykinin (Bildquelle: PubChem Compound <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3.2 Bradykinin B1-Antagonist

Die Blockade des Bradykinin B1-Rezeptors erfolgte durch den Antagonisten B 6929 (Sigma, Deisenhofen). Die Struktur des Peptids unterscheidet sich von der des Bradykinin. Vor der Aminosäure Arginin an der ersten Position wurde Lysin angehängt. Phenylalanin an Position 8 wurde durch Leucin ersetzt und Arginin an Position 9 entfernt (siehe Abbildung 6). Durch diese Strukturveränderungen wurde eine selektive Bindung an den Bradykinin B1-Rezeptor erreicht. So konnte eine über 10.000-fach höhere Selektivität für eine Bindung dieses Antagonisten an den Bradykinin B1-Rezeptor im

Vergleich zum Bradykinin B2-Rezeptor gezeigt werden [197]. Neben der hohen Selektivität gilt B 6929 auch aufgrund seiner fehlenden Beeinflussung der Wirkung von Bradykinin auf den B2-Rezeptor als einer der potentesten Antagonisten [34]. Die pEC₅₀ (effective dose 50%, pA₂) lag in unterschiedlichen Spezies zwischen 8,0 und 7,0. Aufgrund seiner Eigenschaften wurde der Antagonist häufig für die Charakterisierung, Klassifizierung und Identifizierung der unterschiedlichen Bradykinin Rezeptoren sowie zur Untersuchung deren Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen angewandt [143].

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 µg/kg KG gelöst als Bolus 15 min vor Bradykinin-Infusion intravenös injiziert, darauf folgte eine kontinuierliche Infusion von 300 ng/kg/min bis zum Versuchsende.

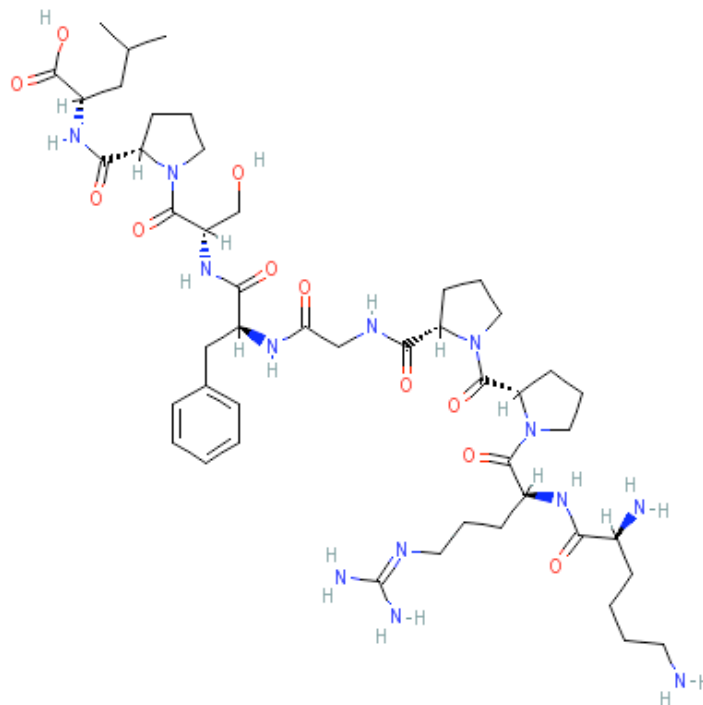


Abbildung 6: Strukturformel des Bradykinin B1-Rezeptorantagonisten B 6929 (Bildquelle: PubChem Compound <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3.3 Bradykinin B2-Antagonist

Die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors erfolgte durch den Antagonisten Hoe 140 (Sigma, Deisenhofen). Dieser unterscheidet sich von Bradykinin durch die folgende Struktur: D-Arginyl-L-Arginyl-L-Prolyl-Trans-4-Hydroxy-L-Prolylglycyl-3-(2-Thienyl)-L-Alanyl-L-Seryl-D-1,2,3,4-Tetrahydro-3-Isoquinolinecarbonyl-L-(2 α , 3 β , 7 $\alpha\beta$)-Octahydro-1H-Indole-2-Carbonyl-L-Arginine (siehe Abbildung 7). Durch diese Strukturveränderungen konnte eine hohe Spezifität verbunden mit einer hohen Wirksamkeit sowie eine hohe Rezeptoraffinität in verschiedenen Spezies erzielt werden.

Es wurde eine Wirkungsdauer von über 60 Minuten festgestellt, die aus dem strukturbedingt geringeren enzymatischen Abbau resultiert. Die pEC_{50} (effective dose 50%, pA_2) lag in unterschiedlichen Spezies zwischen 8,3 und 9,2 [143]. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde Hoe 140 in zahlreichen in vivo Untersuchungen zur Antagonisierung von exogenem Bradykinin verwendet [91, 192].

Auch bei diesem Antagonisten wurden in der vorliegenden Arbeit initial 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG gelöst als Bolus 15 min vor Bradykinin-Infusion intravenös injiziert, und es folgte darauf eine kontinuierliche Infusion von 300 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ bis zum Versuchsende.

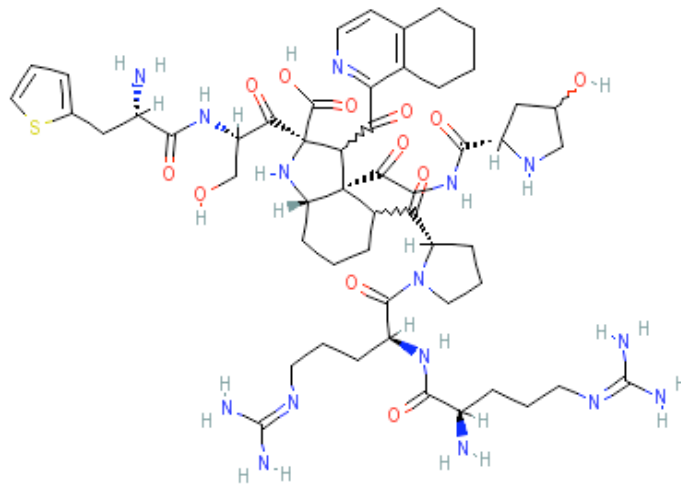


Abbildung 7: Strukturformel des Bradykinin B2-Rezeptorantagonisten Hoe140 (Bildquelle: PubChem Compound <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4 Versuchsgruppen

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung der intraarteriellen Bradykinininfusion wurde mit sechs Versuchsgruppen durchgeführt. Sechs Tiere erhielten eine Infusion von 0,2 ml der Trägersubstanz NaCl. Jeweils sechs Versuchstiere erhielten 0,2 ml einer von fünf verschiedenen Dosierungen einer Bradykinin-Lösung (10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, $2,5 \times 10^{-2}$ M, 10^{-1} M Bradykinin, Trägersubstanz NaCl).

Zur Blockade der Bradykinin-Rezeptoren erhielten jeweils sechs Versuchstiere zusätzlich zur effektivsten Bradykinin-Dosierung den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten HOE 140 bzw. den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten B 6929.

2.5 Statistik

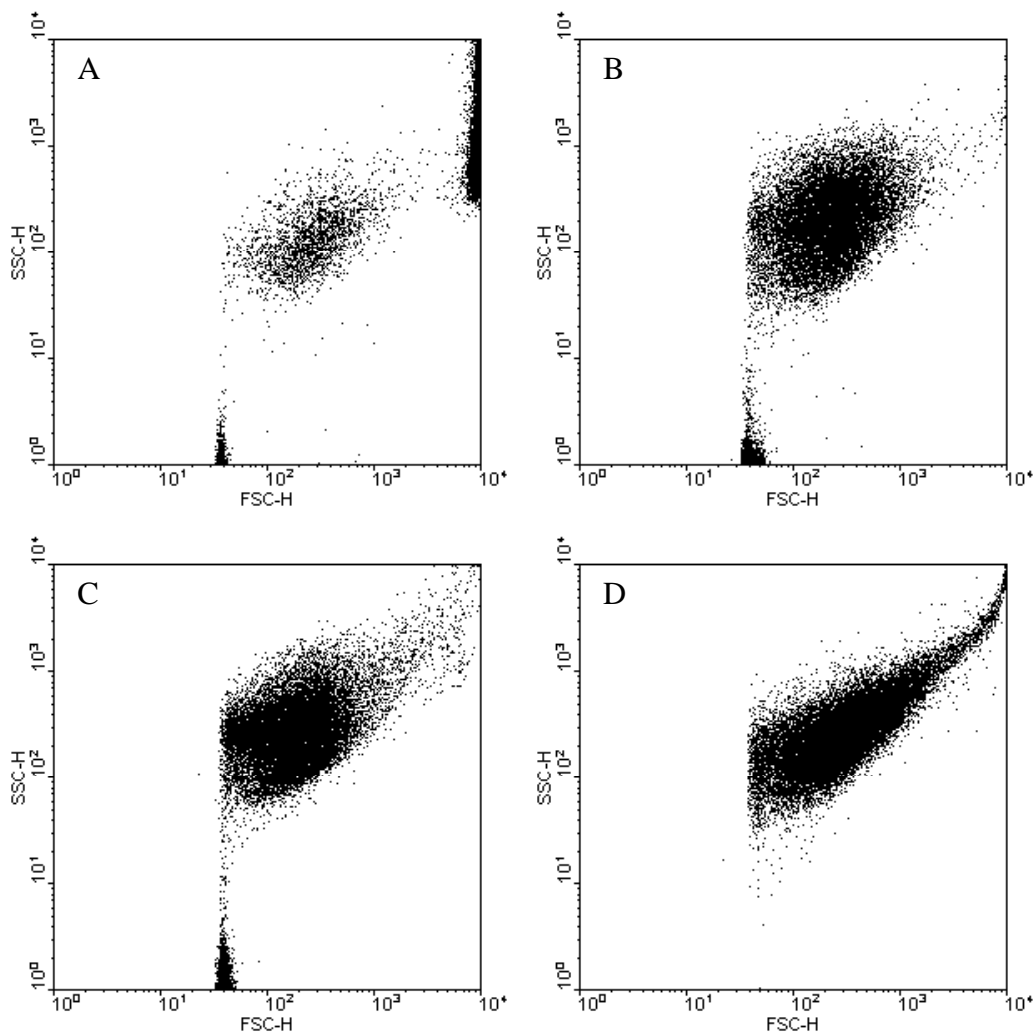
Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM). Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm Sigma Stat 3.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) durchgeführt. Aufgrund der geringen Tierzahlen in den einzelnen Versuchsgruppen war davon auszugehen, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Zur Analyse möglicher Unterschiede zwischen dem Ausgangswert und folgenden Messungen wurde der Rangsummentest ANOVA nach Friedman angewandt. Im Falle eines Unterschiedes wurde anschließend mit dem Test nach Dunnett geprüft. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Bradykinin-Gruppen und zwischen der Gruppe mit der effektivsten Bradykinin-Dosierung und den Gruppen, die einen Bradykinin-Rezeptorantagonisten erhielten, wurden mit dem Rangsummentest nach Kruskal-Wallis geprüft. Hier wurde im Falle eines Unterschiedes nachfolgend ebenfalls der Dunnett-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombozytenfunktion

3.1.1 Thrombozytenfunktion in vitro

Die Durchflusszytometrie der Thrombozyten im Vollblut (Abbildung 8A) zeigte eine homogene Gruppe von Messwerten entsprechend den einzelnen Zellmessungen. Die zirkuläre Form der Messwolke ist dabei Ausdruck für die gleichmäßige Größe und Granularität der einzelnen Thrombozyten. Die Isolation der Thrombozyten (Abbildung 8B) und ihre Färbung mit CFDA-SE (Abbildung 8C) hatten keinen Einfluss auf die Größe und die Granularität. Die Hinzugabe des schwachen Thrombozytenstimulators ADP (200 μM) zeigte eine elliptisch veränderte Form der Messwolke, welche die Veränderungen von Größe und Granularität der Thrombozyten und Thrombozytenaggregation repräsentiert (Abbildung 8D). Durch den starken Thrombozytenstimulator Thrombin (1000 U/l) wurde dieses Phänomen verstärkt ausgelöst (Abbildung 8E).



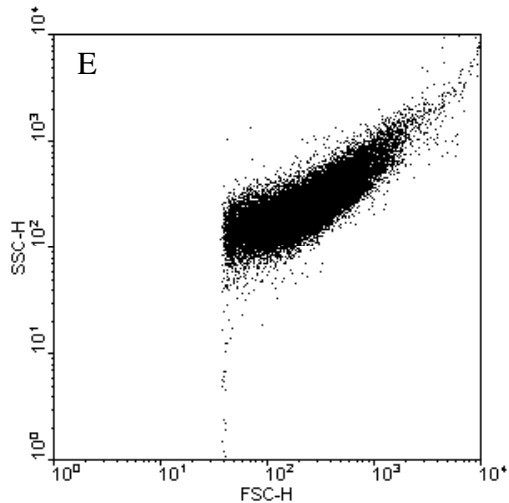


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Die Abbildungen A - E zeigen exemplarisch die Ergebnisse der FACS-Untersuchung eines Experiments. Die einzelnen Messwerte sind exponentiell jeweils bezüglich ihrer Größe (FSC-H) und ihrer Granularität (SSC-H) dargestellt.

3.1.2 Thrombozytenfunktion in vivo

Zu Beginn der Beleuchtung der jeweiligen Gefäßabschnitte wurden rollende Thrombozyten in pialen Arteriolen nur selten beobachtet, eine Adhärenz von Thrombozyten am Gefäßendothel trat zu diesem Zeitpunkt nicht auf. Die Anzahl rollender Thrombozyten betrug $2,6 \pm 1,3 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ zu Beginn und $29,0 \pm 7,7 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ nach 6 Minuten Beleuchtung. Der Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert war nach 2 Minuten signifikant erhöht. Eine signifikante Steigerung der Anzahl adhärenter Thrombozyten wurde nicht beobachtet. Diese betrug zu Beginn $0,0 \pm 0,0 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und nach 6 Minuten Beleuchtung $1,7 \pm 0,6 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Thrombozyten-Endothelinteraktionen in Arteriolen

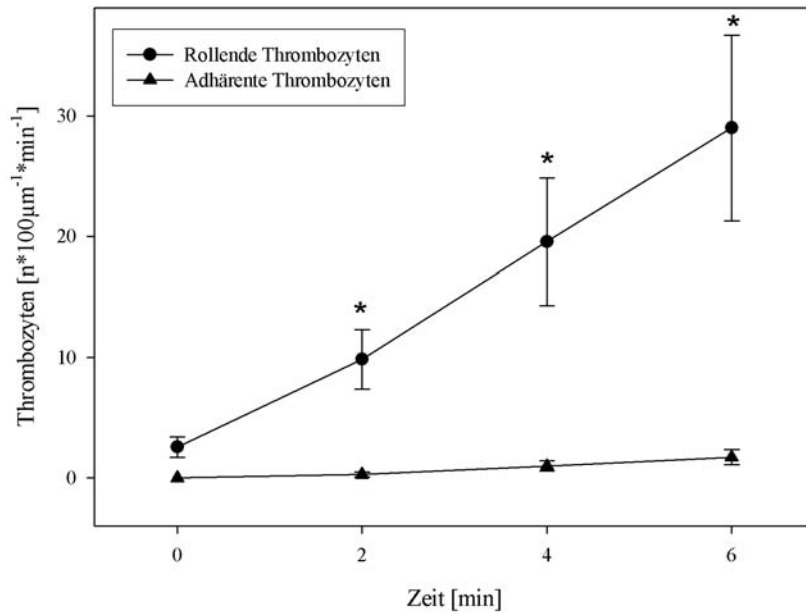


Abbildung 9: Rollende und adhärenente Thrombozyten in pialen Arteriolen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Beleuchtung zur Initiierung der Photothrombose. Die Anzahl rollender Thrombozyten stieg ab 2 Minuten signifikant an, bei der Anzahl adhärenente Thrombozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten. * $p < 0,05$ vs. 0 Minuten (Ausgangswert zu Beginn der Beleuchtung). MW \pm SEM. Friedman Test mit Dunnnett-Prozedur.

Die Interaktion der Thrombozyten mit dem Gefäßendothel verhielt sich in den Venolen ähnlich wie in den Arteriolen. Zu Beginn der Beleuchtung betrug die Anzahl rollender Thrombozyten in den Venolen $3,9 \pm 0,8 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, nach 6 Minuten Beleuchtung $36,6 \pm 5,2 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Die Anzahl der adhärenente Thrombozyten belief sich zu Beginn der Beleuchtung auf $0,0 \pm 0,0 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und nach 6 Minuten Beleuchtung auf $13,8 \pm 2,2 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Nach 6 Minuten Beleuchtung kam es in den Gefäßen zur Bildung eines Abscheidungsthrombus, der das jeweilige Gefäß zuletzt vollständig verschloss.

Thrombozyten-Endothelinteraktionen in Venolen

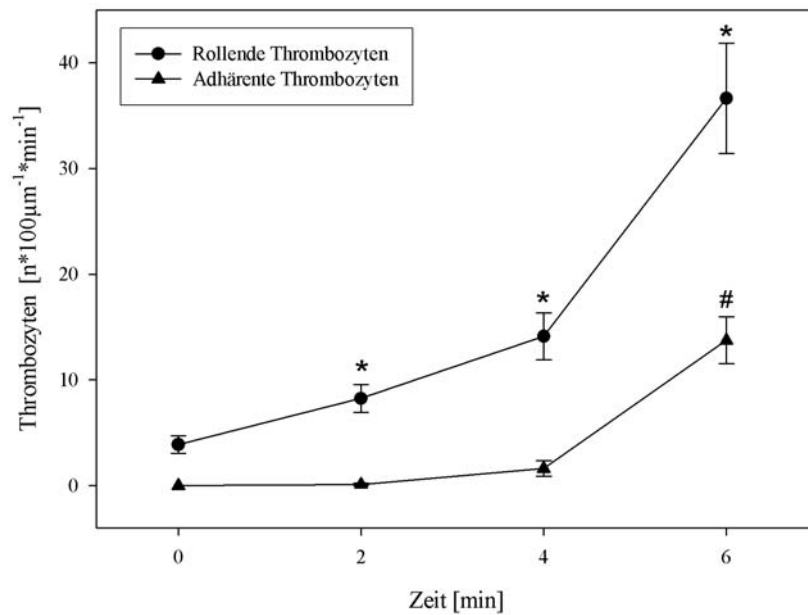


Abbildung 10: Rollende und adhärente Thrombozyten in postkapillären Venolen zu den verschiedenen Messzeitpunkten nach Beginn der Beleuchtung zur Initiierung der Photothrombose. Die Anzahl rollender Thrombozyten stieg ab 2 Minuten signifikant an, die Anzahl adhärenter Thrombozyten war nach 6 Minuten signifikant erhöht. * und # $p < 0,05$ vs. 0 Minuten (Ausgangswert zu Beginn der Beleuchtung). $MW \pm SEM$. Friedman Test mit Dunnett-Prozedur.

3.2 Dosisfindung

Die Durchführung der Versuche zeigte, dass es sich bei der höchsten Bradykinin Dosis (10^{-1} M Bradykinin) um eine letale Dosis handelt. Drei von sechs Versuchstieren in dieser Gruppe verstarben während der Bradykinin-Infusion. Die Ergebnisse dieser Versuchsgruppe werden im Folgenden nicht dargestellt.

3.2.1 Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur

Der mittlere arterielle Blutdruck blieb in der Kontrollphase in allen Versuchsgruppen konstant. In der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen mit den Bradykinin-Infusionen von 10^{-4} M und 10^{-3} M Bradykinin blieb der mittlere arterielle Blutdruck während des gesamten Versuchsverlaufs stabil. Die Infusion von 10^{-2} M Bradykinin führte während der Infusion zu einem kurzzeitigen Blutdruckabfall im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Infusion von $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin führte zu einem Blutdruckabfall im Vergleich zum Ausgangswert. In beiden Versuchsgruppen erreichte der Blutdruck nach Ende der Infusion wieder höhere Werte.

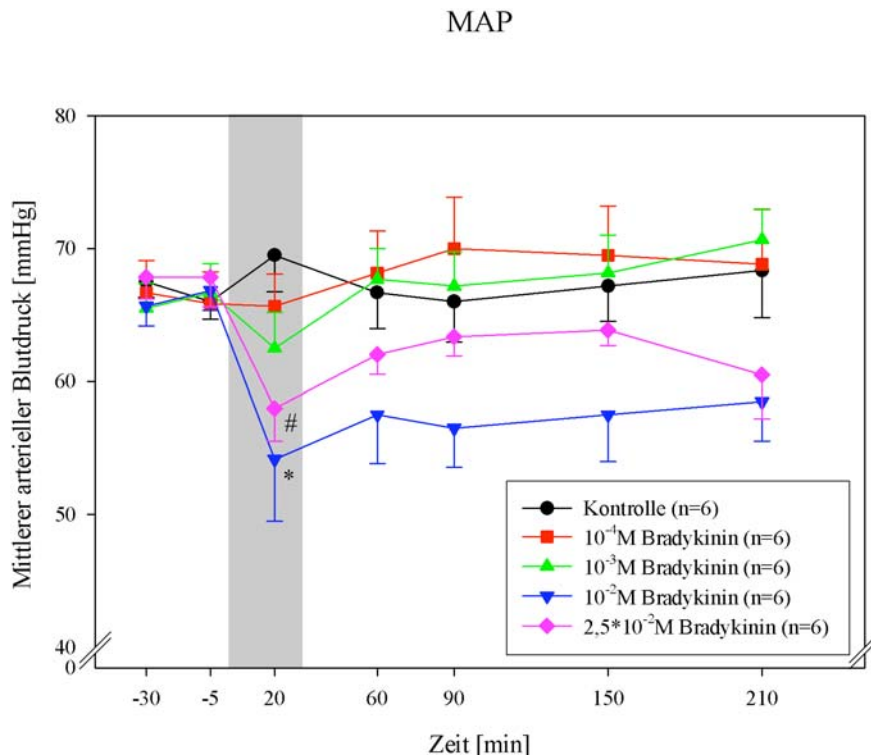


Abbildung 11: Der mittlere arterielle Blutdruck vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen mit niedrigdosierter Bradykinin-Infusion blieb der Blutdruck während des gesamten Versuchsverlaufs konstant. In den beiden höher dosierten Versuchsgruppen kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Blutdruckabfall. Dabei war der Wert für die Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin signifikant niedriger als der Ausgangswert, der Wert für die Gruppe mit 10^{-2} M Bradykinin signifikant niedriger als der Wert der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt. Nach der Infusion erholten sich in diesen Gruppen die Blutdruckwerte wieder. * $p < 0,05$

vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

Die Konzentration von Halothan im dem Gasgemisch, das den Versuchstieren zugeführt wurde, betrug in der Kontrollphase 0,9%, während der Bradykinin-Infusion 0,8% und nach der Infusion 0,7%. Die rektale Körpertemperatur wurde durch die rückgekoppelte Wärmeplatte konstant auf 37°C gehalten.

3.2.2 Blutwerte von Leukozyten, Thrombozyten und Hämoglobin

Aufgrund des geringen Körpergewichts der Versuchstiere wurden bei jedem Versuchstier nur 3 Blutproben zur Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozyten-Anzahl im Vollblut und des Hämoglobinwertes untersucht. Die Anzahl der Leukozyten blieb in der Kontrollgruppe konstant, in den Versuchsgruppen mit Bradykinin-Infusion kam es zu einem Anstieg der Leukozytenzahl, der Unterschied war statistisch nicht signifikant. Zwischen den Versuchsgruppen bestand zu den verschiedenen Messzeitpunkten kein Unterschied.

	Vor Infusion der Thr. Leukoz. [$10^9/l$]	Nach Infusion der Thr. Leukoz. [$10^9/l$]	Versuchsende Leukoz. [$10^9/l$]
Kontrollgruppe	10,4 \pm 1,8	10,6 \pm 2,7	11,1 \pm 1,3
10 ⁻⁴ M Bradykinin	6,9 \pm 1,3	9,7 \pm 1,2	11,7 \pm 1,2
10 ⁻³ M Bradykinin	7,6 \pm 0,9	9,2 \pm 0,8	11,1 \pm 2,1
10 ⁻² M Bradykinin	6,8 \pm 1,4	8,1 \pm 1,4	10,6 \pm 0,7
2,5*10 ⁻² M Bradykinin	6,2 \pm 1,0	7,1 \pm 1,7	9,7 \pm 1,5

Tabelle 3: Anzahl der Leukozyten im Vollblut [$10^9/l$] in den einzelnen Versuchsgruppen vor und nach Infusion der CFDA-SE-markierten Thrombozyten sowie am Versuchsende. In der Kontrollgruppe blieb die Anzahl der Leukozyten konstant. Bei den Versuchsgruppen, die eine Bradykinin-Infusion erhielten, kam es zu einem leichten Anstieg der Leukozytenanzahl, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Die Anzahl der Thrombozyten im Vollblut blieb im Verlauf des gesamten Versuchs weitgehend konstant, die Werte der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

	Vor Infusion der Thr. Thr. [$10^9/l$]	Nach Infusion der Thr. Thr. [$10^9/l$]	Versuchsende Thr. [$10^9/l$]
Kontrollgruppe	131,3±38,7	174,0±102,0	173,8±48,2
10^{-4} M Bradykinin	284,5±49,6	292,6±53,3	236,2±48,7
10^{-3} M Bradykinin	360,8±47,2	309,2±57,9	264,6±19,4
10^{-2} M Bradykinin	253,5±56,5	312,5±39,1	304,3±42,0
$2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin	304,0±27,0	258,3±54,9	225,0±44,2

Tabelle 4: Anzahl der Thrombozyten im Vollblut [$10^9/l$] in den einzelnen Versuchsgruppen vor und nach Infusion der CFDA-SE-markierten Thrombozyten sowie am Versuchsende. Zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten der einzelnen Gruppen und zwischen den Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Hämoglobinwerte der einzelnen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Auch zwischen den Versuchsgruppen bestand kein Unterschied.

	Vor Infusion der Thr. Hb. [g/dl]	Nach Infusion der Thr. Hb. [g/dl]	Versuchsende Hb. [g/dl]
Kontrollgruppe	9,6±0,6	10,2±1,2	9,0±0,7
10^{-4} M Bradykinin	9,1±0,5	8,9±0,2	8,8±0,8
10^{-3} M Bradykinin	8,9±0,3	9,2±0,4	8,3±0,3
10^{-2} M Bradykinin	8,5±0,4	8,7±0,4	9,0±0,3
$2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin	8,4±0,4	8,5±0,4	8,6±0,5

Tabelle 5: Hämoglobinwerte [g/dl] in den einzelnen Versuchsgruppen vor und nach Infusion der CFDA-SE-markierten Thrombozyten sowie am Versuchsende. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Versuchsgruppe oder zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.2.3 Gefäßdurchmesser

In jeder Versuchsgruppe wurden bei den 6 Versuchstieren die Durchmesser von insgesamt 24 Arteriole und 24 Venolen analysiert. Während der Infusion von Bradykinin kam es in den beiden Gruppen mit der höheren Bradykinin-Dosierung zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Abnahme der arteriölen Gefäßdurchmesser, nach der Infusion erholten sich die Werte wieder. In der Kontrollgruppe und den Gruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion blieben die arteriölen Gefäßdurchmesser konstant.

Arteriöläre Gefäßdurchmesser

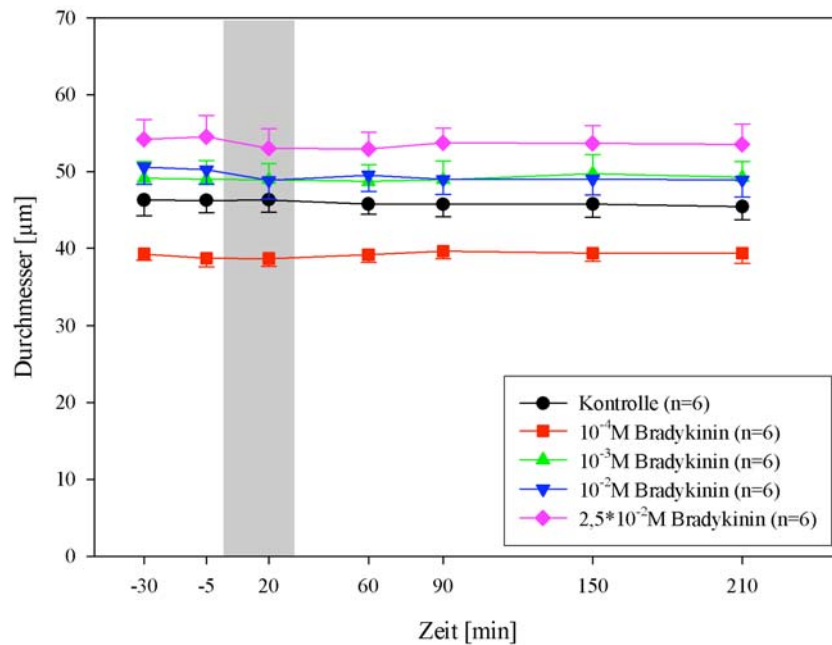


Abbildung 12: Arteriöläre Gefäßdurchmesser vor, während und nach Infusion von Bradykinin (grauer Balken). Der arteriöläre Gefäßdurchmesser verringerte sich in den beiden höher dosierten Bradykinin-Gruppen während der Infusion geringfügig, danach erreichte er wieder höhere Werte. In der Kontrollgruppe und den beiden niedrig dosierten Bradykinin-Gruppen blieb der Durchmesser der Arteriolen konstant. $MW \pm SEM$.

Die Gefäßdurchmesser der untersuchten Venolen blieben in allen Versuchsgruppen während des gesamten Versuchszeitraumes konstant.

Venoläre Gefäßdurchmesser

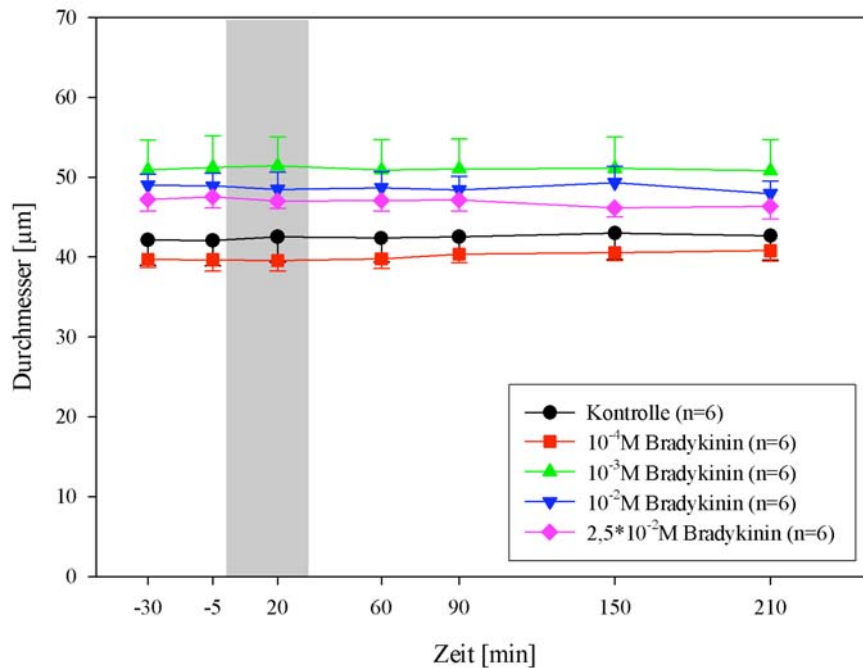


Abbildung 13: Gefäßdurchmesser der pialen Venolen vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In den einzelnen Versuchsgruppen blieben die Durchmesser der Venolen während des Untersuchungszeitraumes konstant. MW \pm SEM.

3.2.4 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Leukozyten-Endothelinteraktionen wurden in allen Versuchen nur in den postkapillären Venolen beobachtet. Wie bei der Bestimmung der Gefäßdurchmesser wurden in jeder Versuchsgruppe insgesamt 24 Venolen untersucht. Die Anzahl der rollenden Leukozyten stieg im Verlauf des Versuches an und erreichte bei allen Versuchsgruppen 210 Minuten nach Infusions-Beginn ihr Maximum mit $12,7 \pm 3,7 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Kontrollgruppe, $13,8 \pm 4,9 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-4}M Bradykinin-Infusion, $54,5 \pm 14,3 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-3}M Bradykinin-Infusion, $55,8 \pm 10,5 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-2}M Bradykinin-Infusion und $40,9 \pm 12,5 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ Bradykinin-Infusion. Dabei unterschieden sich die Werte der Gruppen mit der Dosierung von 10^{-3}M und 10^{-2}M Bradykinin 90 Minuten nach Beginn der Infusion signifikant von der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied blieb bis zum Versuchsende erhalten. In der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der Infusion von 10^{-4}M Bradykinin war die Anzahl rollender Leukozyten 150 Minuten nach Beginn der Infusion signifikant im Vergleich zum Ausgangswert erhöht. In den übrigen Versuchsgruppen trat ein signifikanter Unterschied bereits 90 Minuten nach Beginn der Infusion auf.

Rollende Leukozyten

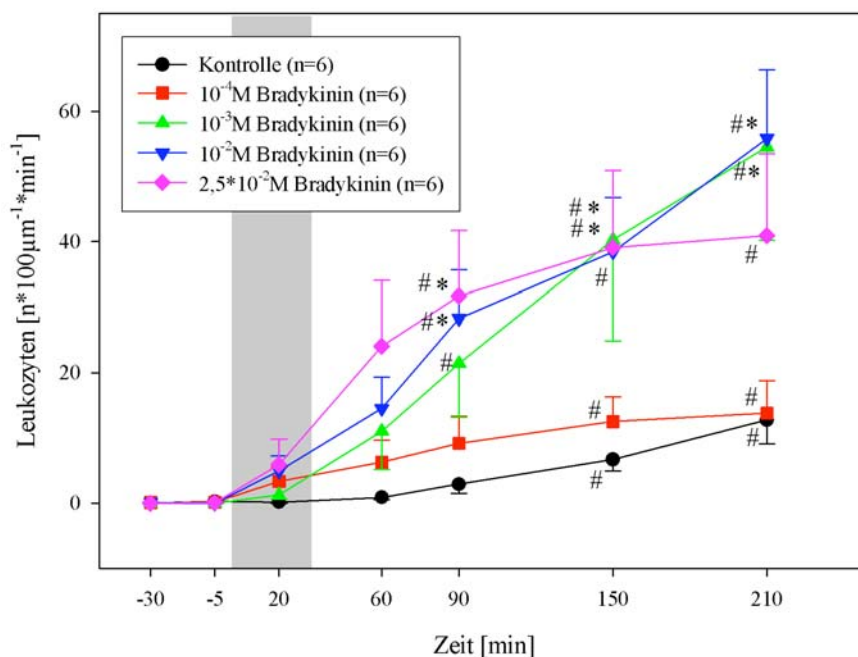


Abbildung 14: Anzahl rollender Leukozyten vor, während und nach Infusion von Bradykinin (grauer Balken). In den Versuchsgruppen mit der Infusion von 10^{-3} M und 10^{-2} M Bradykinin war die Anzahl rollender Leukozyten 90 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant erhöht. In allen Versuchsgruppen kam es im Verlauf des Versuchszeitraumes zu einer signifikanten Steigerung der rollenden Leukozyten im Vergleich zum Ausgangswert. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). $MW \pm SEM$.

In der Kontrollgruppe und den beiden niedrig dosierten Bradykinin-Gruppen stieg die Anzahl der adhärenenten Leukozyten kontinuierlich während des Versuchsablaufes an und erreichte den höchsten Wert 210 Minuten nach Beginn der Infusion mit $1,9 \pm 0,6 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Kontrollgruppe, $2,3 \pm 0,8 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-4} M Bradykinin und $2,9 \pm 0,7 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-3} M Bradykinin. In den beiden höher dosierten Bradykinin-Gruppen kam es zu einem Anstieg der Anzahl der adhärenenten Leukozyten, gefolgt von einem späteren Abfall, die Höchstwerte wurden 90 Minuten nach Infusionsbeginn beobachtet mit $4,0 \pm 1,0 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-2} M Bradykinin und $4,2 \pm 2,0 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit $2,5 \times 10^{-2}$ M Bradykinin. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bestanden nicht.

Adhärenente Leukozyten

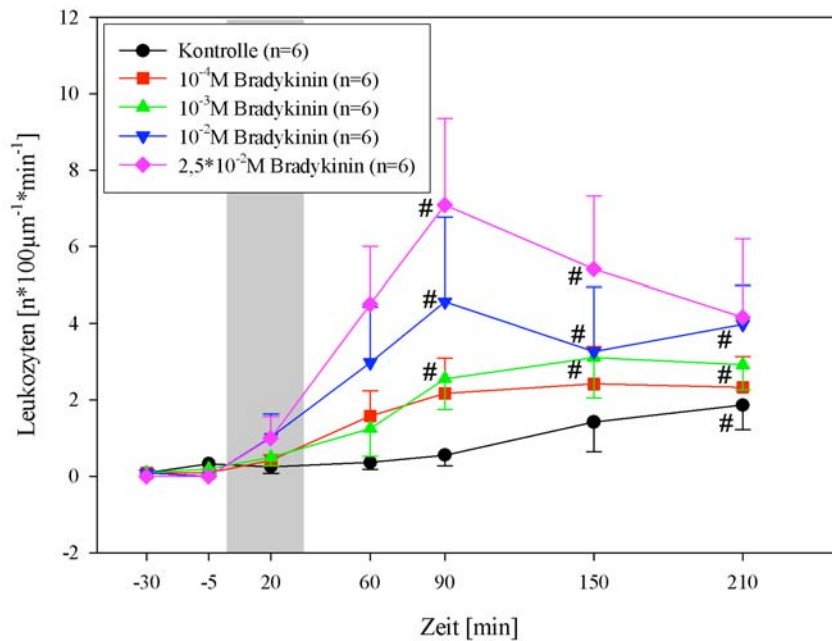


Abbildung 15: Anzahl adhärenente Leukozyten vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In allen Gruppen stieg die Anzahl der adhärenente Leukozyten im Vergleich zum Ausgangswert an, der Höchstwert wurde bei der Kontrollgruppe und den niedrig dosierten Bradykinin-Gruppen 210 Minuten nach Beginn der Infusion beobachtet, bei den höher dosierten Bradykinin-Gruppen kam es zu einem stärkeren Anstieg mit höchstem Wert 90 Minuten nach Beginn der Infusion. Anschließend nahm die Anzahl der adhärenente Leukozyten wieder ab. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). $MW \pm SEM$.

3.2.5 Thrombozyten-Endothelinteraktionen

Thrombozyten-Endothelinteraktionen wurden in allen Versuchen nur in den postkapillären Venolen beobachtet. Die Anzahl rollender Thrombozyten betrug am Anfang der Versuchszeit in allen Versuchsgruppen $0,0 \pm 0,0 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. In der Kontrollgruppe und den beiden Versuchsgruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion kam es im Versuchsverlauf zu einem langsamen Anstieg der Anzahl rollender Thrombozyten, die höchsten Werte wurden am Ende der Versuchszeit beobachtet mit $0,7 \pm 0,3 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Kontrollgruppe, $1,3 \pm 0,7 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-4}M Bradykinin und $4,3 \pm 1,3 \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-3}M Bradykinin. In den Versuchsgruppen mit höherer Bradykinin-Infusion kam es zu einem ausgeprägten Anstieg der Anzahl rollender Thrombozyten nach Beginn der Infusion, die Höchstwerte wurden in diesen beiden Gruppen 90 Minuten nach Beginn der Infusion erreicht mit $7,1 \pm 3,3$ rollenden Thrombozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe mit 10^{-2}M Bradykinin und $10,8 \pm 5,0$ rollenden Thrombozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$

in der Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin. Adhärente Thrombozyten wurden in den einzelnen Versuchsgruppen während der gesamten Versuchsdauer nicht beobachtet.

Rollende Thrombozyten

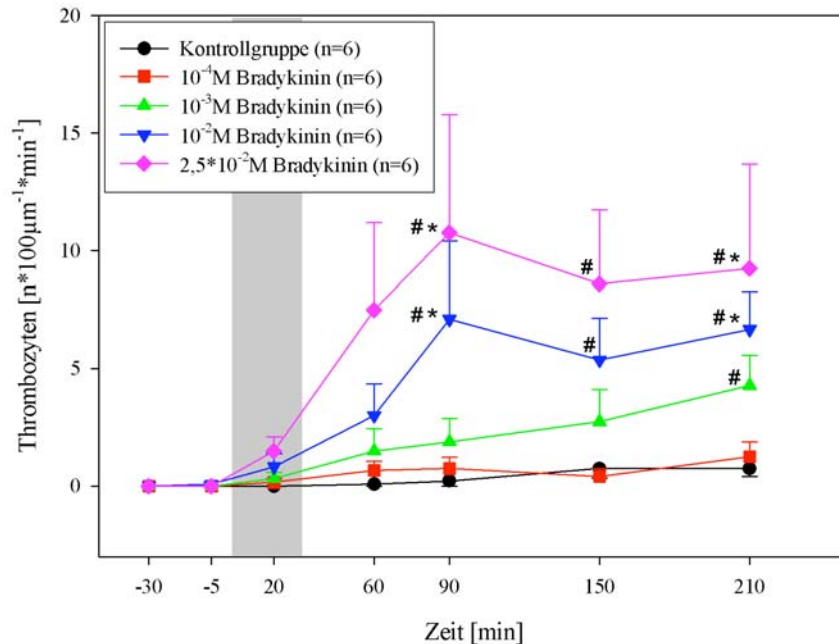


Abbildung 16: Rollende Thrombozyten in postkapillären Venolen vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In der Kontrollgruppe und den beiden niedrig dosierten Bradykinin-Gruppen kam es zu einem geringen Anstieg der rollenden Thrombozyten bis zum Versuchsende. In den Versuchsgruppen mit höher dosierter Bradykinin-Infusion kam es nach Beginn der Infusion zu einem Anstieg der rollenden Thrombozyten mit Höchstwert 90 Minuten nach Beginn der Infusion. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde nur in diesen Gruppen beobachtet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.2.6 Funktionelle Kapillardichte

In der Kontrollgruppe und den beiden Versuchsgruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion blieb die Kapillardichte während des Untersuchungszeitraumes konstant. Die Werte lagen zwischen $147,1 \pm 5,2$ cm/cm² und $156,4 \pm 10,2$ cm/cm² in der Kontrollgruppe, $137,3 \pm 10,7$ cm/cm² und $153,7 \pm 4,8$ cm/cm² in der Gruppe mit 10^{-4} M Bradykinin und $135,3 \pm 7,4$ cm/cm² und $152,9 \pm 5,2$ cm/cm² in der Gruppe mit 10^{-3} M Bradykinin. In den beiden höher dosierten Bradykinin-Gruppen fiel die Kapillardichte nach Bradykinin-Infusion ab. Die Werte in diesen Gruppen lagen zwischen $130,4 \pm 6,6$ cm/cm² und $165,2 \pm 7,0$ cm/cm² in der Gruppe mit 10^{-2} M Bradykinin und $134,6 \pm 10,0$ cm/cm² und $166,1 \pm 10,8$ cm/cm² in der Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin.

Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt.

Kapillardichte

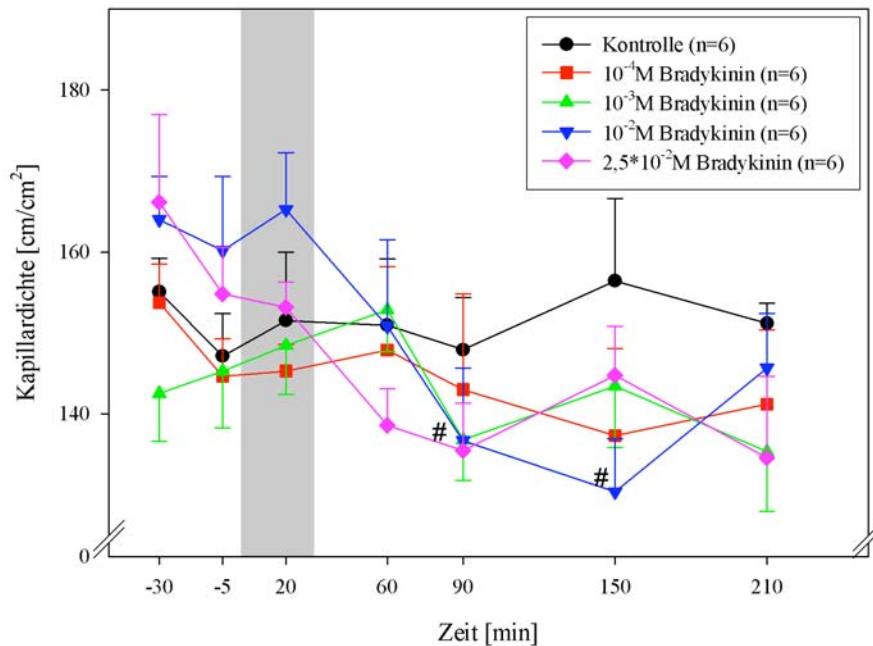


Abbildung 17: Kapillardichte vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In der Kontrollgruppe und den beiden Gruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion blieb die Kapillardichte während des gesamten Versuchszeitraums konstant. In den beiden höher dosierten Gruppen kam es zu einem Abfall der Kapillardichte. In der Versuchsgruppe mit 10^{-2} M Bradykinin-Infusion waren die Werte 90 und 150 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erniedrigt. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden nicht festgestellt. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). $MW \pm SEM$.

3.2.7 Laser-Doppler-Fluxmetrie

Bei der Messung der mikrovaskulären Durchblutung der linken Hemisphäre durch die Laser-Doppler-Fluxmetrie blieben die Werte der Kontrollgruppe während des Versuchszeitraums konstant. In den Versuchsgruppen mit niedriger Bradykinin-Infusion blieben die Werte zunächst unverändert. Erst 90 Minuten nach Infusionsbeginn stiegen sie leicht an. Dieser Anstieg war bei der Gruppe mit 10^{-3} M Bradykinin im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erhöht, mit dem Höchstwert von $119,7 \pm 6,6$ % des Ausgangswertes 150 Minuten nach Beginn der Infusion. In den beiden Gruppen mit höher dosierter Bradykinin-Infusion kam es während der Infusion zu einem Abfall des Laser-Doppler-Flows, nach Ende der Infusion erholten sich die Werte wieder. In der Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin war der Wert während der Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $65,3 \pm 7,5$ % des Ausgangswertes signifikant erniedrigt.

Laser-Doppler-Flow (linke Hemisphäre)

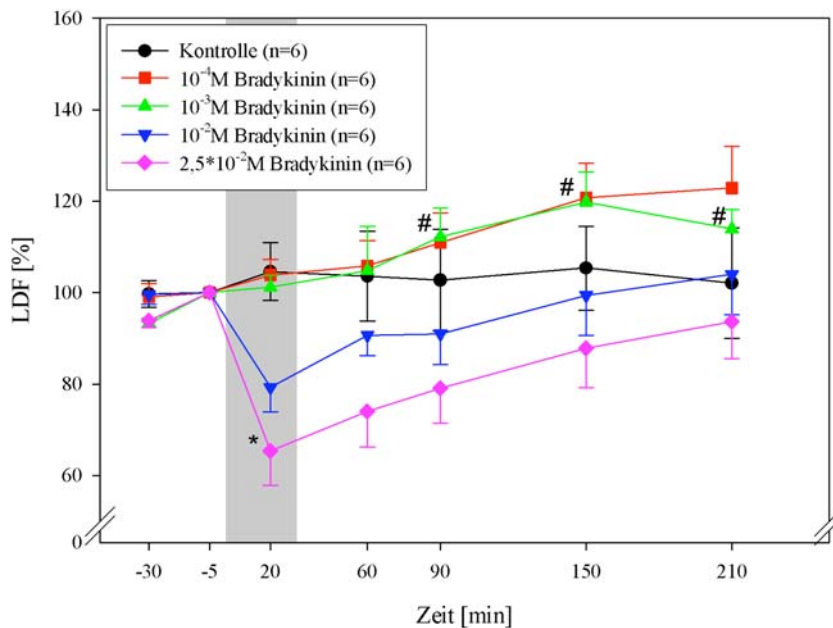


Abbildung 18: Laser-Doppler-Fluxmetrie der linken Hemisphäre vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). Die Werte der Kontrollgruppe blieben während des Versuchszeitraumes konstant. In den beiden Gruppen mit niedriger Bradykinin-Infusion waren die Werte zu Beginn konstant, 90 Minuten nach Infusionsbeginn kam es zu einem leichten Anstieg. In den beiden Gruppen mit höher dosierter Bradykinin-Infusion kam es während der Infusion zu einem Abfall des Laser-Doppler-Flows, nach Ende der Infusion erreichten die Werte wieder das Ausgangsniveau. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

Bei der Laser-Doppler-Fluxmetrie der rechten Hemisphäre blieben die Werte der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 10^{-3} M Bradykinin während des gesamten Versuchsverlaufs konstant. In der Versuchsgruppe mit 10^{-4} M Bradykinin blieben die Werte zu Beginn konstant, 90 Minuten nach Infusionsbeginn stiegen die Werte signifikant im Vergleich zum Ausgangswert an, mit dem Höchstwert von $125,0 \pm 6,0$ % des Ausgangswertes 210 Minuten nach Beginn der Infusion. Bei den Versuchsgruppen mit höher dosierter Bradykinin-Infusion kam es analog zur Gegenseite während der Infusion zu einem Abfall des Laser-Doppler-Flows, nach Infusionsende stiegen die Werte wieder an und erreichten bis zum Versuchsende das Ausgangsniveau. Dabei unterschied sich der Wert der Gruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin 20 Minuten nach Beginn der Infusion mit $70,0 \pm 4,9$ % des Ausgangswertes signifikant von der Kontrollgruppe.

Laser-Doppler-Flow (rechte Hemisphäre)

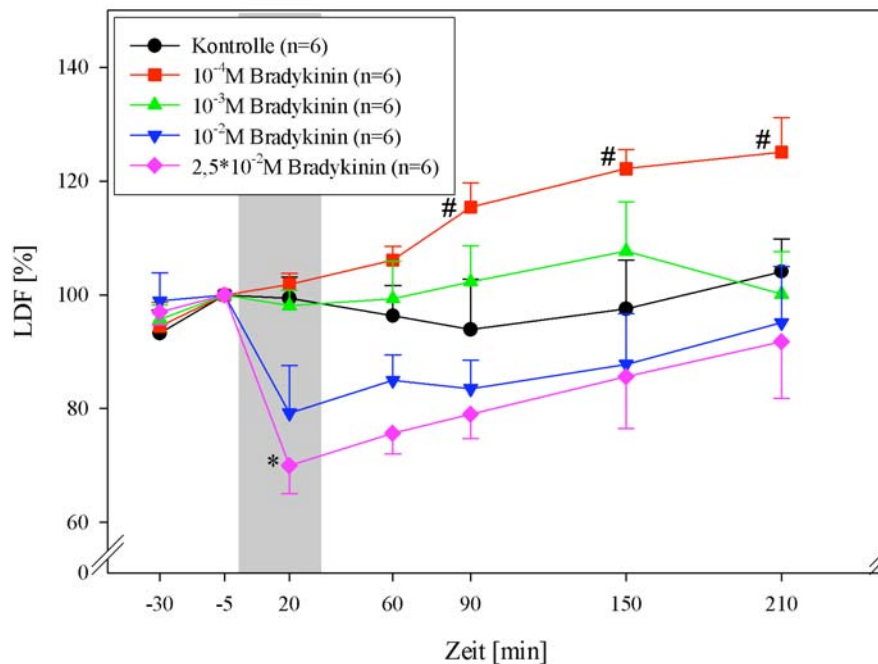


Abbildung 19: Laser-Doppler-Fluxmetrie der rechten Hemisphäre vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). Die Werte der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 10^{-3} M Bradykinin blieben während des gesamten Versuchsverlaufs konstant. Die mikrovaskuläre Durchblutung der Gruppe mit 10^{-4} M Bradykinin blieb zuerst konstant, 90 Minuten nach Infusionsende stiegen die Werte an. In den beiden höher dosierten Bradykinin-Gruppen kam es während der Infusion zu einem Abfall der Werte, bis zum Ende des Versuchs erholten sie sich wieder. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.2.8 Arterio-venöse Transitzeit

Die arterio-venöse Transitzeit blieb in der Kontrollgruppe und den beiden Gruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion während des gesamten Versuchsablaufs konstant. In der Gruppe mit 10^{-2} M Bradykinin stieg die arterio-venöse Transitzeit signifikant im Vergleich zum Ausgangswert an, nach Infusionsende sanken die Werte kontinuierlich ab und erreichten bis zum Ende des Versuchs das Ausgangsniveau. In der Versuchsgruppe mit $2,5 \cdot 10^{-2}$ M Bradykinin stieg die arterio-venöse Transitzeit ebenfalls während der Infusion an, zu diesem Zeitpunkt bestand ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert und zur Kontrollgruppe. Auch in dieser Gruppe sanken die Werte nach Infusionsende wieder.

Arterio-venöse Transitzeit

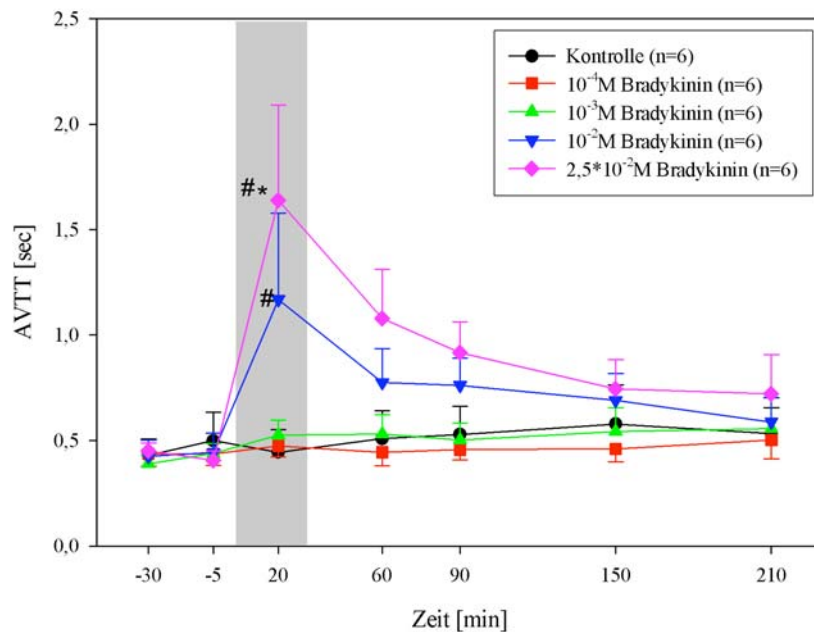


Abbildung 20: Arterio-venöse Transitzeit vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken). In der Kontrollgruppe und den beiden niedrig dosierten Bradykinin-Gruppen blieben die Werte konstant. In den beiden höher dosierten Bradykinin-Gruppen kam es zu einem Anstieg der Werte während der Infusion, nach Ende der Infusion erreichten die Werte wieder das Ausgangsniveau. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.2.9 Histologie

Die Auswertung der mit Esterase gefärbten Hirnschnitte zeigte in der Kontrollgruppe eine Anzahl von $6,7 \pm 1,2$ Zellen im ausgewählten Schnitt der linken Hemisphäre und $5,8 \pm 0,8$ Zellen im gleichen Schnitt in der rechten Hemisphäre. In den Gruppen mit Bradykinin-Infusion war die Anzahl der Esterase-positiven Zellen höher als in der Kontrollgruppe, die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren nicht signifikant. Die höchsten Werte wurden in der Gruppe mit 10^{-2} M Bradykinin erreicht, mit $19,7 \pm 5,0$ Zellen in der linken Hemisphäre und $15,0 \pm 4,1$ Zellen in der rechten Hemisphäre.

Esterasefärbung

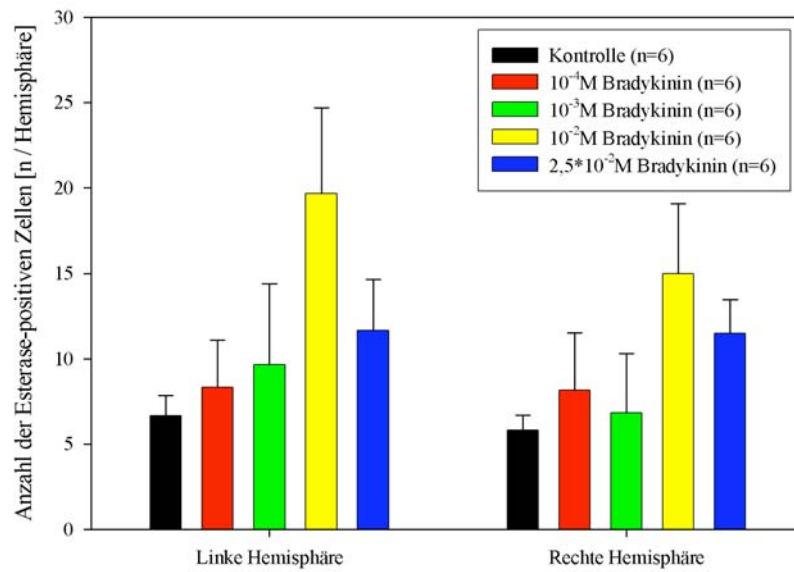


Abbildung 21: Die Anzahl Esterase-positiver Zellen in der rechten und linken Hemisphäre in den einzelnen Versuchsgruppen. Durch Bradykinin-Infusion zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der Anzahl der Esterase-positiven Zellen in den Hemisphären, die Unterschiede waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. $MW \pm SEM$.

3.3 Bradykininrezeptor-Antagonisierung

Als effektivste Dosis wurde die Versuchsgruppe mit der Bradykinin-Infusion von 10^{-2} M ausgewählt. Die folgenden Ergebnisse zeigen eine Gruppe, die zusätzlich zur Infusion von 10^{-2} M Bradykinin den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, und eine Gruppe, die zusätzlich zur Infusion von 10^{-2} M Bradykinin den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten erhielt, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe die nur 10^{-2} M Bradykinin erhielt.

3.3.1 Makrohämodynamik, Narkoseführung und Temperatur

Der mittlere arterielle Blutdruck blieb in allen Versuchsgruppen während der Kontrollphase konstant. In der Kontrollgruppe und der Gruppe mit dem B1-Rezeptorantagonisten kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Abfall des Blutdrucks. Nach Ende der Infusion stiegen die Werte wieder, erreichten aber nicht das Ausgangsniveau. In der Gruppe mit dem B1-Rezeptorantagonisten kam es am Ende des Beobachtungszeitraums zu einem erneuten Abfall des Blutdrucks, der Wert zu diesem Zeitpunkt war im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erniedrigt. In der Gruppe, die den B2-Rezeptorantagonisten erhielt, kam es ebenfalls während der Bradykinin-Infusion zu einem Blutdruckabfall, die Werte erreichten aber nach Infusions-Ende das Ausgangsniveau.

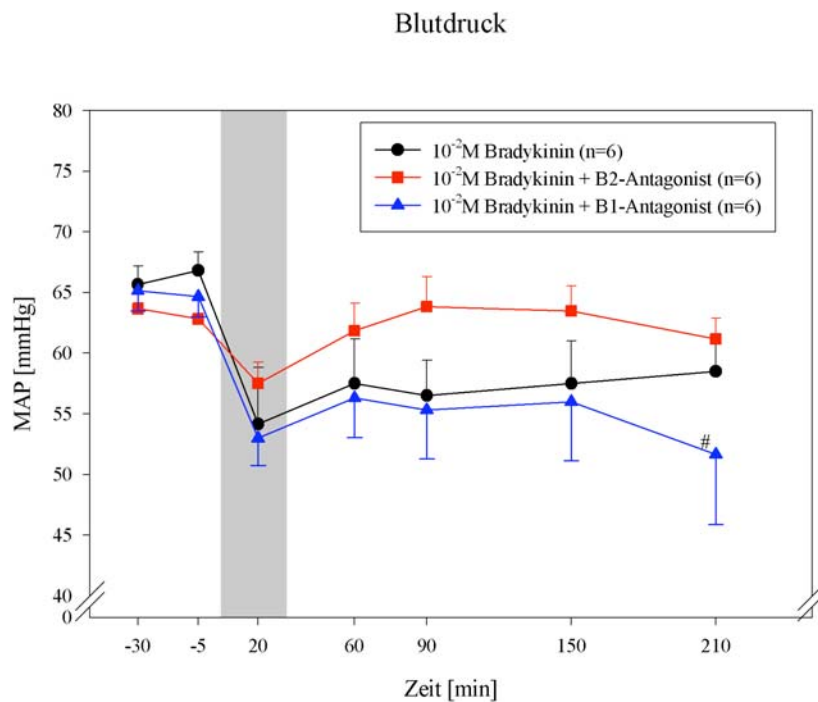


Abbildung 22: Mittlerer arterieller Blutdruck vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Während der Infusion kam es bei allen Gruppen zu einem nicht-signifikantem Abfall des Blutdrucks, nach Infusionsende wurden wieder höhere Werte erreicht. In der Gruppe, die den B2-Rezeptorantagonisten erhielt, erreichten die Werte

nach Ende der Infusion wieder das Ausgangsniveau. In der Gruppe mit B1-Antagonist kam es bei der letzten Messung 210 Minuten nach Beginn der Infusion zu einem signifikantem Abfall des Blutdrucks im Vergleich zum Ausgangswert. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.3.2 Blutwerte von Leukozyten, Thrombozyten und Hämatokrit

Die Anzahl der Leukozyten im Vollblut stieg in allen Gruppen während der gesamten Versuchsdauer leicht an. In der Versuchsgruppe mit dem Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten war der Wert am Versuchsende im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erhöht. Zwischen den Versuchsgruppen bestanden keine Unterschiede.

	Vor Infusion der Thr. Leukozyt. [$10^9/l$]	Nach Infusion der Thr. Leukozyt. [$10^9/l$]	Versuchsende Leukozyt. [$10^9/l$]
10^{-2} M Bradykinin	6,8 \pm 1,4	8,1 \pm 1,4	10,6 \pm 0,7
10^{-2} M BK + B1-Ant.	6,9 \pm 1,9	8,9 \pm 1,0	13,2 \pm 0,8 #
10^{-2} M BK + B2-Ant.	7,3 \pm 1,3	9,1 \pm 0,7	10,0 \pm 2,7

Tabelle 6: Anzahl der Leukozyten im Vollblut [$10^9/l$] vor und nach Infusion der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. In der Versuchsgruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, kam es im Versuchsverlauf zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenanzahl im Vergleich zum Ausgangswert. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert. MW \pm SEM.

Die Anzahl der Thrombozyten im Vollblut blieb in den Versuchsgruppen während des Versuchsablaufs konstant. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht.

	Vor Infusion der Thr. Thr. [$10^9/l$]	Nach Infusion der Thr. Thr. [$10^9/l$]	Versuchsende Thr. [$10^9/l$]
10^{-2} M Bradykinin	253,5 \pm 56,5	312,5 \pm 39,1	304,3 \pm 42,0
10^{-2} M BK + B1-Ant.	365,5 \pm 28,5	360,3 \pm 37,7	251,8 \pm 40,0
10^{-2} M BK + B2-Ant.	309,0 \pm 63,9	268,8 \pm 38,0	313,0 \pm 22,6

Tabelle 7: Anzahl der Thrombozyten im Vollblut [$10^9/l$] vor und nach Infusion der CFDA-SE-markierten Thrombozyten sowie am Ende des Beobachtungszeitraums. Die Werte blieben in allen Gruppen konstant. MW \pm SEM.

Der Hämoglobinwert in den einzelnen Versuchsgruppen blieb während des gesamten Versuchs konstant. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

	Vor Infusion der Thr. Hb. [g/dl]	Nach Infusion der Thr. Hb. [g/dl]	Versuchsende Hb. [g/dl]
10^{-2} M Bradykinin	8,5±0,4	8,7±0,4	9,0±0,3
10^{-2} M BK + B1-Ant.	8,6±0,3	8,4±0,6	9,5±0,3
10^{-2} M BK + B2-Ant.	8,9±0,2	9,3±0,9	8,7±0,6

Tabelle 8: Hämoglobinwerte [g/dl] vor und nach Infusion der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten und am Ende des Beobachtungszeitraums. Die Werte blieben während des gesamten Versuchsverlaufs konstant, es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen. MW ± SEM.

3.3.3 Gefäßdurchmesser

Wie in den Versuchen zur Dosisfindung wurden in jeder Versuchsgruppe insgesamt 24 Arteriolen und 24 Venolen untersucht. Die Durchmesser der Arteriolen blieben in allen Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraums konstant.

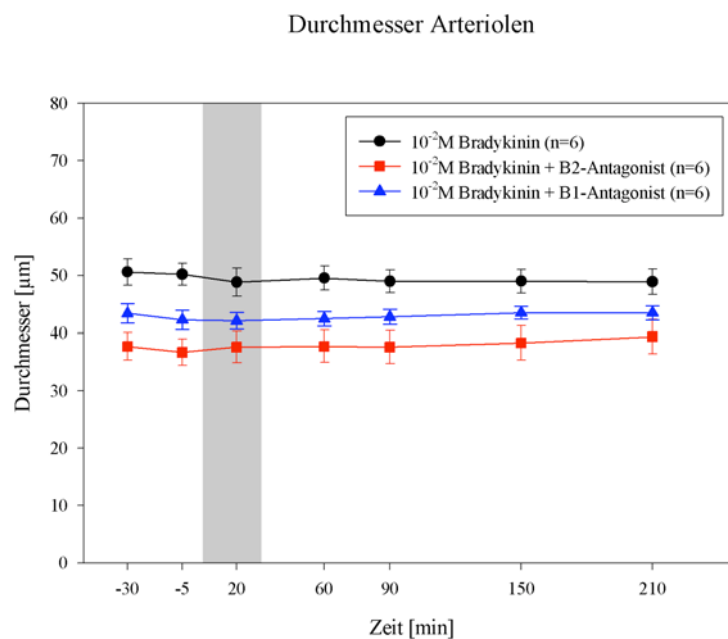


Abbildung 23: Arteriolenäre Gefäßdurchmesser vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Die Durchmesser der Arteriolen blieben in allen Versuchsgruppen während des Beobachtungszeitraums konstant. MW ± SEM.

Die Durchmesser der Venolen blieben ebenfalls in allen Versuchsgruppen während des gesamten Versuchszeitraums konstant.

Durchmesser Venolen

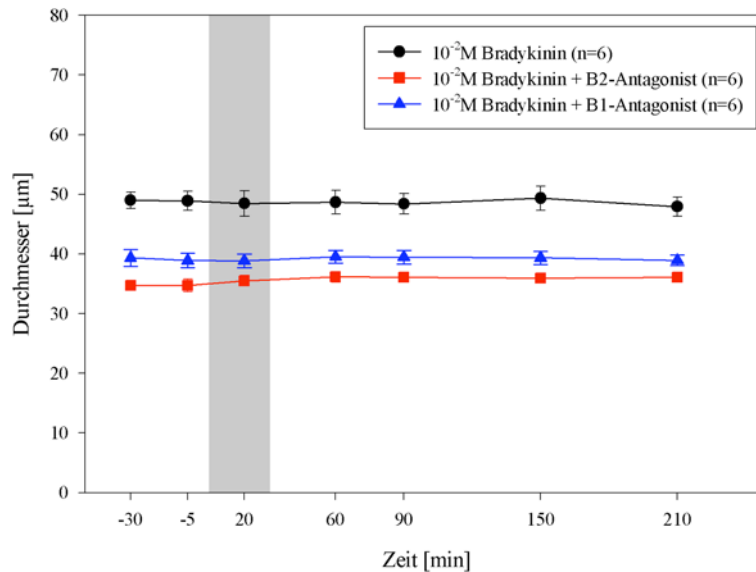


Abbildung 24: Venoläre Gefäßdurchmesser vor, während und nach Bradykinin-Infusion und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Die Durchmesser blieben in allen Versuchsgruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant. MW ± SEM.

3.3.4 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Wie in den Versuchen zur Dosisfindung wurden auch in diesen Versuchen Leukozyten-Endothelinteraktionen nur in postkapillären Venolen beobachtet. Zu Beginn des Versuches konnten rollende Leukozyten in den einzelnen Versuchsgruppen nur gelegentlich nachgewiesen werden. Die Anzahl der rollenden Leukozyten stieg nach Beginn der Bradykinin-Infusion kontinuierlich an und erreichte 210 Minuten nach Beginn der Infusion den Maximalwert mit $55,8 \pm 10,5$ Zellen $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe, die nur 10^{-2}M Bradykinin erhielt, $45,0 \pm 3,3$ Zellen $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe, die zusätzlich den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, und $12,8 \pm 2,7$ Zellen $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in der Gruppe, die zusätzlich zur Bradykinin-Infusion den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten erhielt. Dabei waren die Werte in den drei Versuchsgruppen 90 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zum Ausgangswert signifikant erhöht. Die Anzahl der rollenden Leukozyten war in der Gruppe, die den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten erhielt, 150 und 210 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zur Gruppe, die nur Bradykinin erhielt, signifikant erhöht.

Rollende Leukozyten

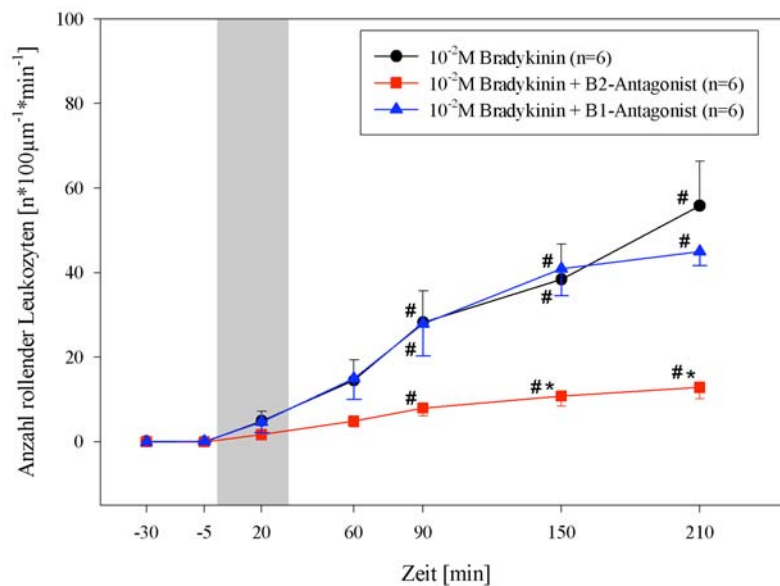


Abbildung 25: Anzahl rollender Leukozyten vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Die Anzahl der rollenden Leukozyten stieg nach Beginn der Bradykinin-Infusion in allen Gruppen an. 150 und 210 Minuten nach Beginn der Infusion waren die Werte in der Gruppe mit Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist signifikant niedriger als in der Gruppe, die nur die Bradykinin-Infusion erhielt. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). MW \pm SEM.

Adhärenente Leukozyten wurden bis zum Beginn der Bradykinin-Infusion nicht beobachtet, danach kam es zu einem Anstieg der Anzahl am Endothel fest haftender Leukozyten in allen Gruppen. Der Maximalwert wurde in der Gruppe, die 10⁻²M Bradykinin erhielt, mit $4,6 \pm 2,2$ adhärenente Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und in der Gruppe, die zusätzlich den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten erhielt, mit $1,2 \pm 0,4$ adhärenente Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 90 Minuten nach Beginn der Infusion erreicht. In der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, wurde der Höchstwert 210 Minuten nach Beginn der Infusion mit $5,0 \pm 0,7$ adhärenente Leukozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ erreicht.

Adhärenente Leukozyten

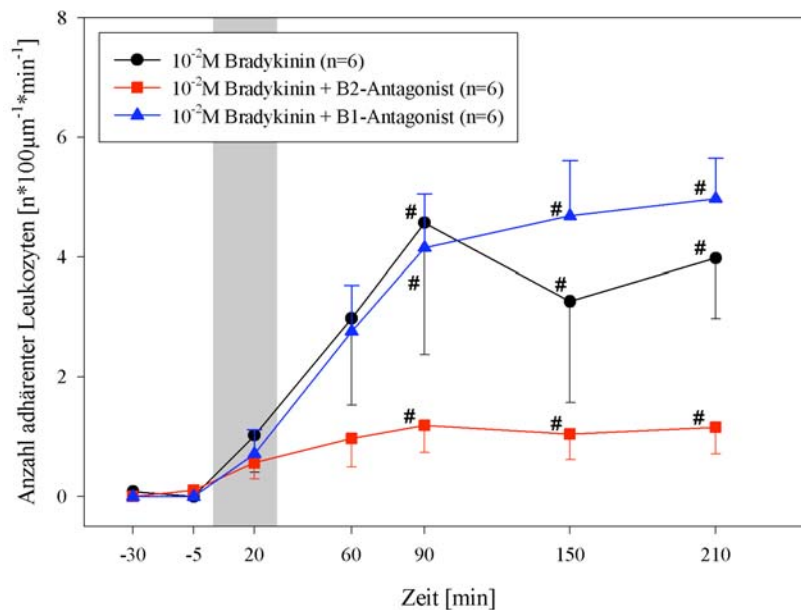


Abbildung 26: Anzahl adhärenente Leukozyten vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. In allen Gruppen kam es 90 Minuten nach Beginn der Infusion zu einem signifikantem Anstieg der fest am Endothel haftenden Leukozyten. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). $MW \pm SEM$.

3.3.5 Thrombozyten-Endothelinteraktionen

Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes wurden in den drei Versuchsgruppen keine Thrombozyten-Endothelinteraktionen beobachtet. Während der gesamten Versuchsdauer kam es zu keiner Adhärenz von Thrombozyten am Gefäßendothel. Die Anzahl rollender Thrombozyten erreichte in der Versuchsgruppe ohne Bradykinin-Rezeptorantagonist den Höchstwert mit $7,1 \pm 3,3$ Thrombozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 90 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Gabe, in der Gruppe, die zusätzlich den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, wurde der Höchstwert mit $7,2 \pm 1,4$ Thrombozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 150 min. nach Beginn der Bradykinin-Infusion erreicht und in der Gruppe, die zusätzlich den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten erhielt, mit $1,5 \pm 0,7$ Thrombozyten $\times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 210 min. nach Beginn der Bradykinin-Infusion. Dabei unterschied sich der Wert der Gruppe mit B2-Rezeptorantagonist 210 Minuten nach Beginn der Infusion signifikant von der Gruppe, die keinen Antagonisten erhielt.

Rollende Thrombozyten

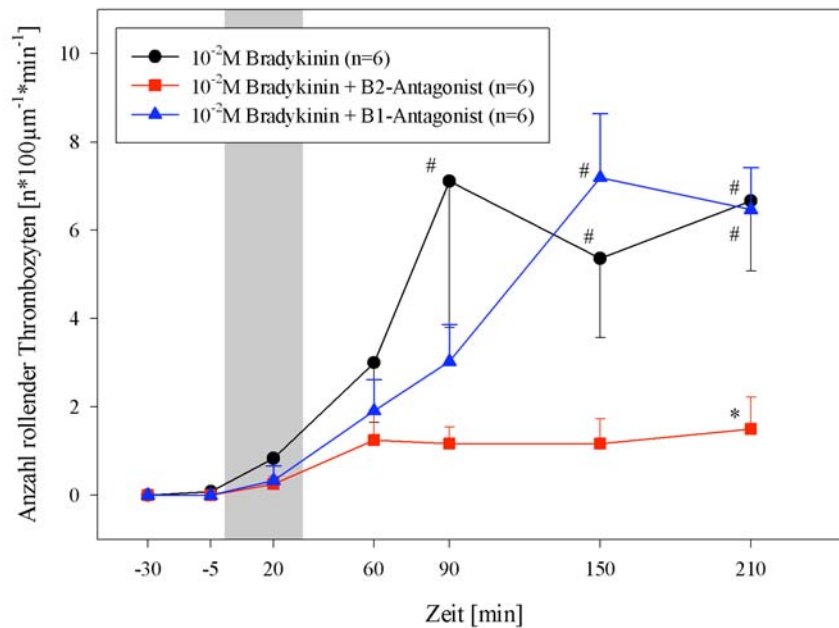


Abbildung 27: Anzahl rollender Thrombozyten in postkapillären Venolen vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Antagonisten. In der Gruppe ohne Bradykinin-Rezeptorantagonist und der Gruppe mit Bradykinin-B1-Rezeptorantagonist kam es nach der Bradykinin-Infusion zu einem Anstieg der Anzahl rollender Thrombozyten. In der Gruppe, die den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist erhalten hatte, kam es zu keiner signifikanten Steigerung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.3.6 Funktionelle Kapillardichte

In der Gruppe mit dem Bradykinin-B2-Rezeptorantagonisten blieb die Kapillardichte während des gesamten Versuchszeitraums konstant. Die Werte lagen zwischen $135,2 \pm 6,2$ cm/cm² und $119,5 \pm 10,2$ cm/cm². In der Gruppe ohne den Bradykinin-Rezeptorantagonisten kam es zu einem Abfall der Kapillardichte nach Ende der Bradykinin-Infusion mit einem darauf folgendem Anstieg der Kapillardichte mit Werten zwischen $165,2 \pm 7,0$ cm/cm² und $130,4 \pm 6,6$ cm/cm². In der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, kam es nach Beginn der Bradykinin-Infusion zu einem Abfall der Kapillardichte mit Werten zwischen $152,2 \pm 11,0$ cm/cm² und $52,4 \pm 19,5$ cm/cm².

Kapillardichte

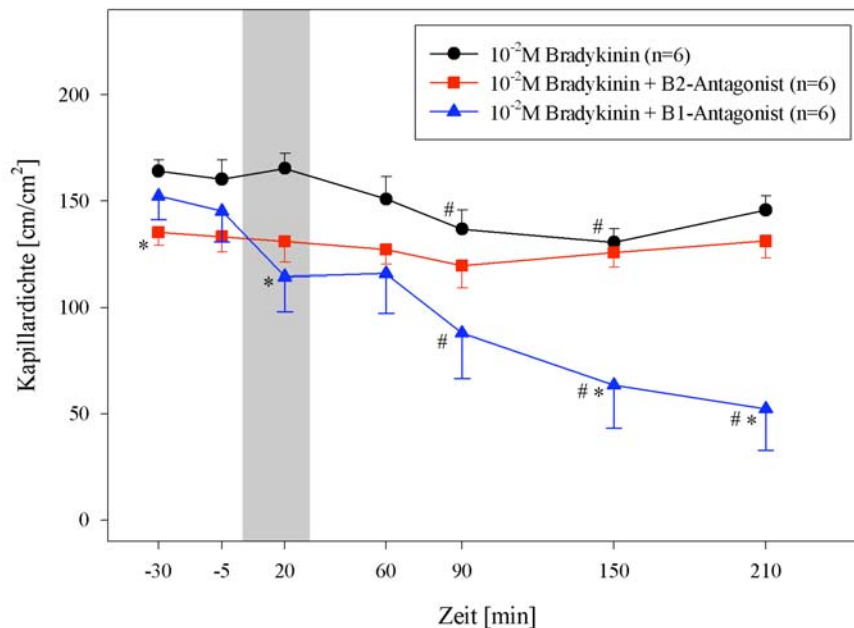


Abbildung 28: Kapillardichte vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe von Bradykinin-Rezeptorantagonisten. In der Gruppe mit B2-Antagonist blieb die Kapillardichte während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant. In der Gruppe ohne Rezeptorantagonist kam es 90 Minuten nach Beginn der Infusion zu einem Abfall der Kapillardichte mit darauf folgendem Wiederanstieg, in der Gruppe mit B1-Rezeptorantagonist kam es nach Beginn der Bradykinin-Infusion zu einem stetigen Abfall der Werte. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.3.7 Laser-Doppler-Fluxmetrie

In der Laser-Doppler-Flowmetrie kam es bei Messung der linken Hemisphäre in der Kontrollgruppe und der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, zu einem Abfall der Werte während der Bradykinin-Infusion gefolgt von einem Anstieg bis auf das Ausgangsniveau. Die Werte lagen in der Kontrollgruppe zwischen $79,2 \pm 5,4$ % und $104,0 \pm 8,8$ % vom Ausgangswert und der Gruppe mit Bradykinin-B1-Rezeptorantagonist zwischen $77,7 \pm 4,7$ % und $101,2 \pm 4,5$ % vom Ausgangswert. In der Gruppe mit Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist blieben die Werte während der Bradykinin-Infusion konstant, nach der Infusion kam es zu einem Anstieg der Werte. In dieser Gruppe lagen die Werte zwischen $99,7 \pm 4,7$ % und $123,5 \pm 11,1$ % vom Ausgangswert.

Linke LDF

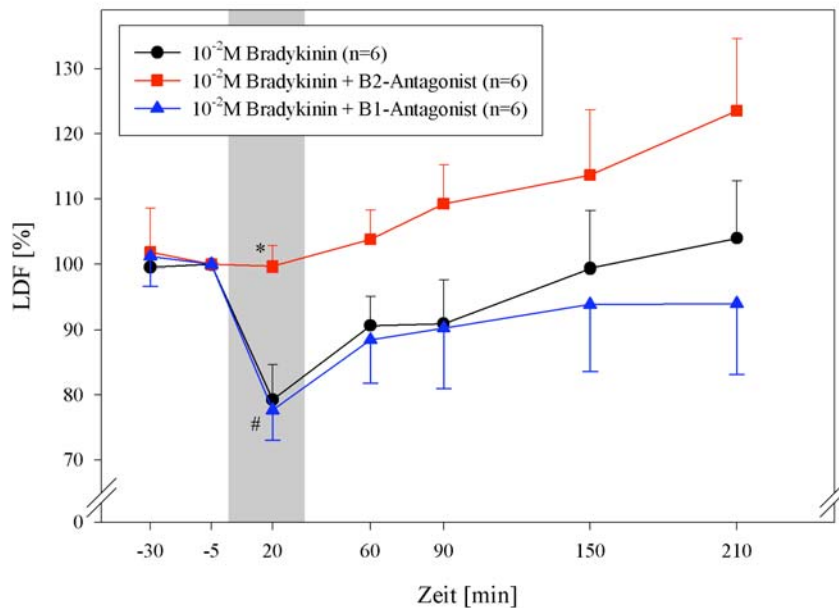


Abbildung 29: Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) der linken Hemisphäre vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Antagonisten. In der Kontrollgruppe und der Gruppe mit dem Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Abfall des Laser-Doppler-Flows mit einem darauf folgenden Anstieg. In der Gruppe mit Bradykinin-B2-Antagonist blieb der Laser-Doppler-Flow während der Infusion konstant und stieg nach Ende der Infusion an. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnett Prozedur). MW \pm SEM.

Analog zur linken Hemisphäre kam es bei der Messung des Laser-Doppler-Flows der rechten Hemisphäre in der Kontrollgruppe und der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, zu einem Abfall der Werte während der Infusion von Bradykinin mit einem darauf folgenden Wideranstieg, dabei wurde in der Gruppe mit dem B1-Antagonisten das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht. Die Werte lagen zwischen $79,2 \pm 8,3$ % und $100,0 \pm 0,0$ % vom Ausgangswert in der Kontrollgruppe und $78,2 \pm 6,9$ % und $103,4 \pm 2,4$ % vom Ausgangswert in der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonist erhielt. In der Gruppe mit Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist kam es nicht zu einem Abfall der Werte während der Bradykinin-Infusion, im Verlauf des Beobachtungszeitraums stiegen die Werte kontinuierlich an und lagen zwischen $97,8 \pm 2,5$ % und $125,1 \pm 9,4$ % vom Ausgangswert.

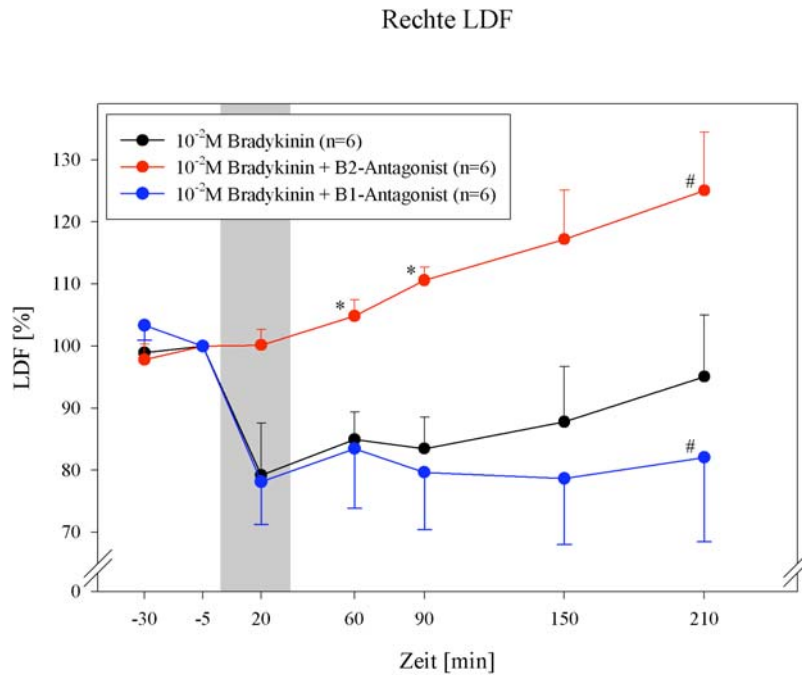


Abbildung 30: Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) der rechten Hemisphäre vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. Wie in der linken Hemisphäre kam es in der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Bradykinin-B1-Rezeptorantagonist zu einem Abfall des Laser-Doppler-Flows während der Bradykinin-Infusion mit darauf folgendem Anstieg der Werte. In der Gruppe die den Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist erhielt stiegen die Werte kontinuierlich an. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert. MW \pm SEM.

3.3.8 Arterio-venöse Transitzeit

Die Werte der arterio-venösen Transitzeit verhalten sich umgekehrt proportional zur Durchblutung. In der Kontrollgruppe kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Anstieg der AVTT mit darauf folgendem Abfall auf Ausgangsniveau. Die Werte lagen in dieser Gruppe zwischen $0,43 \pm 0,08$ und $1,17 \pm 0,41$ Sekunden. In der Gruppe, die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Anstieg der AVTT, die Werte fielen nach Ende der Infusion ab, stiegen aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraums wieder an. In dieser Gruppe lagen die Werte zwischen $0,48 \pm 0,03$ und $1,66 \pm 0,36$ Sekunden. In der Gruppe mit Bradykinin-B2-Rezeptorantagonist blieben die Werte während des Beobachtungszeitraums konstant und lagen zwischen $0,46 \pm 0,07$ und $0,79 \pm 0,27$ Sekunden.

AVTT

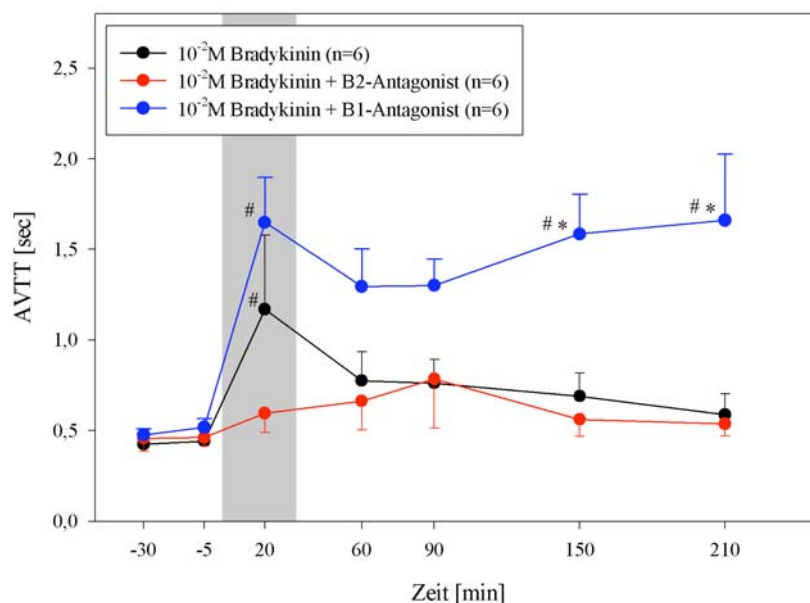


Abbildung 31: Arterio-venöse Transitzeit vor, während und nach Bradykinin-Infusion (grauer Balken) und Gabe verschiedener Bradykinin-Rezeptorantagonisten. In der Kontrollgruppe kam es während der Bradykinin-Infusion zu einem Anstieg der AVTT, nach Ende der Infusion fielen die Werte wieder ab und erreichten das Ausgangsniveau. In der Gruppe mit dem Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten kam es während der Infusion zu einem Anstieg der AVTT, nach Ende der Infusion wurde das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht. In der Gruppe mit dem B2-Rezeptorantagonisten blieben die Werte während dem Beobachtungszeitraum konstant. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (Rangsummentest nach Kruskal-Wallis mit Dunnnett Prozedur). # $p < 0,05$ vs. Ausgangswert (Rangsummentest ANOVA nach Friedman mit Dunnnett Prozedur). MW \pm SEM.

3.3.9 Histologie

In der Kontrollgruppe fanden sich $19,6 \pm 5,0$ Esterase-positive Zellen in der linken Hemisphäre und $15,0 \pm 4,1$ Esterase-positive Zellen in der rechten Hemisphäre. In der Gruppe die den Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten erhielt, fanden sich in der linken Hemisphäre $33,5 \pm 6,6$ Esterase-positive Zellen und in der rechten Hemisphäre $35,5 \pm 7,6$ Esterase-positive Zellen. Der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen war bezüglich beider Hemisphären signifikant. In der Gruppe mit Bradykinin-B1-Rezeptorantagonist betrug die Anzahl Esterase-positiver Zellen in der linken Hemisphäre $10,5 \pm 2,6$ Esterase-positive Zellen und in der rechten Hemisphäre $7,5 \pm 1,2$ Esterase-positive Zellen. Die Werte unterschieden sich dabei nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Esterase-Färbung

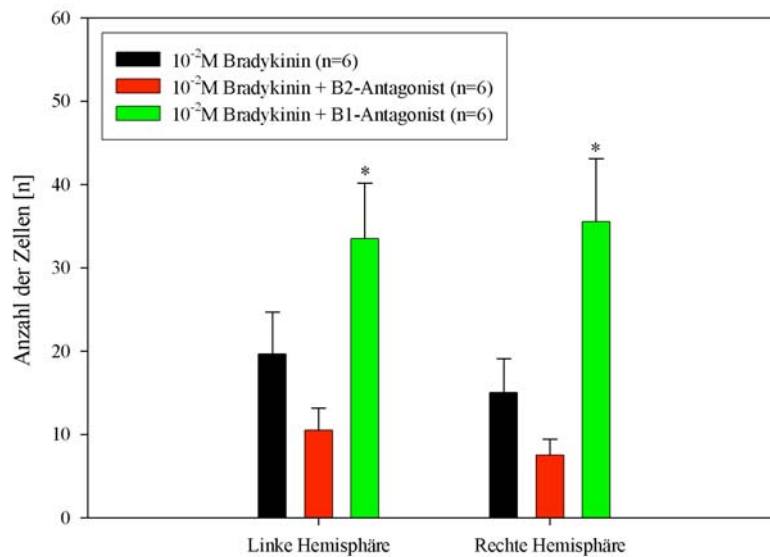


Abbildung 32: Die Anzahl Esterase-positiver Zellen in der linken und rechten Hemisphäre in den Versuchsgruppen. In der Gruppe mit dem Bradykinin-B1-Rezeptorantagonisten war die Anzahl Esterase-positiver Zellen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe, die den B2-Rezeptorantagonisten erhielt, war die Anzahl der Esterase-positiven Zellen niedriger als in der Kontrollgruppe, dieser Unterschied war nicht signifikant. * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. MW \pm SEM.

3.4 Intravitalmikroskopische Aufnahmen

Als Beispiel für die Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation mit der Intravitalmikroskopie werden hier einige Bilder gezeigt. Abbildung 33 zeigt eine Aufnahme aus den Versuchen zur Photothrombose. Nach Beleuchtung des abgebildeten Gefäßabschnitts kam es hier nach wenigen Minuten zu einer erhöhten Anzahl von Thrombozyten-Endothelinteraktionen.

Die Abbildungen 34 – 36 zeigen denselben Gefäßabschnitt einer postkapillären Venole mit den unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern. Abbildung 34 zeigt dabei eine Aufnahme mit dem Texas Red Filter zur Darstellung des Intravasalraums. Bei Abbildung 35 handelt es sich um eine Aufnahme mit dem Rhodamin Filter und wurde zur Beurteilung der Leukozyten-Endothelinteraktion verwendet. Dabei sind frei fließende Leukozyten wegen ihrer hohen Geschwindigkeit nicht zu erkennen. Schnell rollende Leukozyten ziehen 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. Abbildung 36 zeigt eine Aufnahme mit dem Fluoreszein Filter zur Beurteilung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen. Dabei stellen sich die Thrombozyten ähnlich wie die Leukozyten dar, sind jedoch wesentlich kleiner.

Abbildung 37 zeigt eine Aufnahme mit dem Rhodamin Filter zur Beurteilung der funktionellen Kapillardichte nach Gabe eines Rhodamin-Bolus.



Abbildung 33: Postkapilläre Venole nach Photothrombose. Bei den weißen Punkten handelt es sich um CFDA-SE gefärbte Thrombozyten. Maßstab = 50 μm .



Abbildung 34: Postkapilläre Venole zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen in den Versuchen zur Dosisfindung bei intraarterieller Bradykinin-Infusion. Die Aufnahme erfolgte mit dem Texas Red Filter. Durch intravenöse Applikation des Farbstoffs wird das Lumen im Vergleich zur Umgebung dargestellt. Maßstab = 50 μm .



Abbildung 35: Identischer Gefäßabschnitt wie in Abbildung 33, 20 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Infusion. Die Aufnahme erfolgte mit dem Rhodamin Filter und zeigt einzelne am Gefäßendothel adhärierende Leukozyten. Maßstab = 50 μm .



Abbildung 36: Identischer Gefäßabschnitt wie in Abbildung 33 und 34. Die Abbildung wurde mit dem Fluoreszein Filter angefertigt und erfolgte 60 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Infusion. Es zeigt sich ein am Endothel entlang rollender Thrombozyt als weißer Punkt (siehe Pfeil). Maßstab = 50 μm .

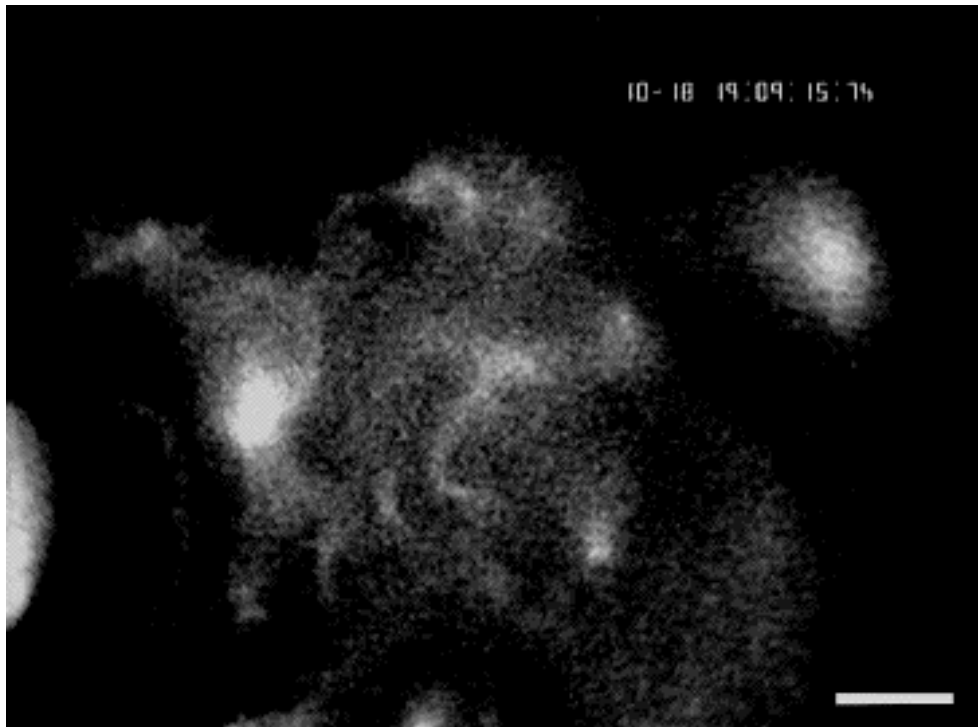


Abbildung 37: Kapillargebiet zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen. Nach Gabe eines Rhodamin-Bolus lassen sich die einzelnen KapillargefäÙe von der Umgebung durch die Fluoreszenz des Farbstoffs unterscheiden, wodurch offline die Beurteilung der Kapillarlänge pro Fläche ermöglicht wird. Maßstab = 50 µm.

3.5 Histologische Aufnahmen

Abbildung 38 zeigt exemplarisch die Aufnahme eines Esterase-gefärbten Schnittes aus dem Thalamus der Wüstenrennmaus. Der Pfeil zeigt auf einen Esterase-positiven Leukozyten, der das Gefäßendothel transmigriert hat. Die Esterase-positiven Zellen unterschieden sich durch die spezifische Färbung deutlich vom umgebenden Gewebe und den Zellen, welche durch die Esterase nicht markiert werden können.

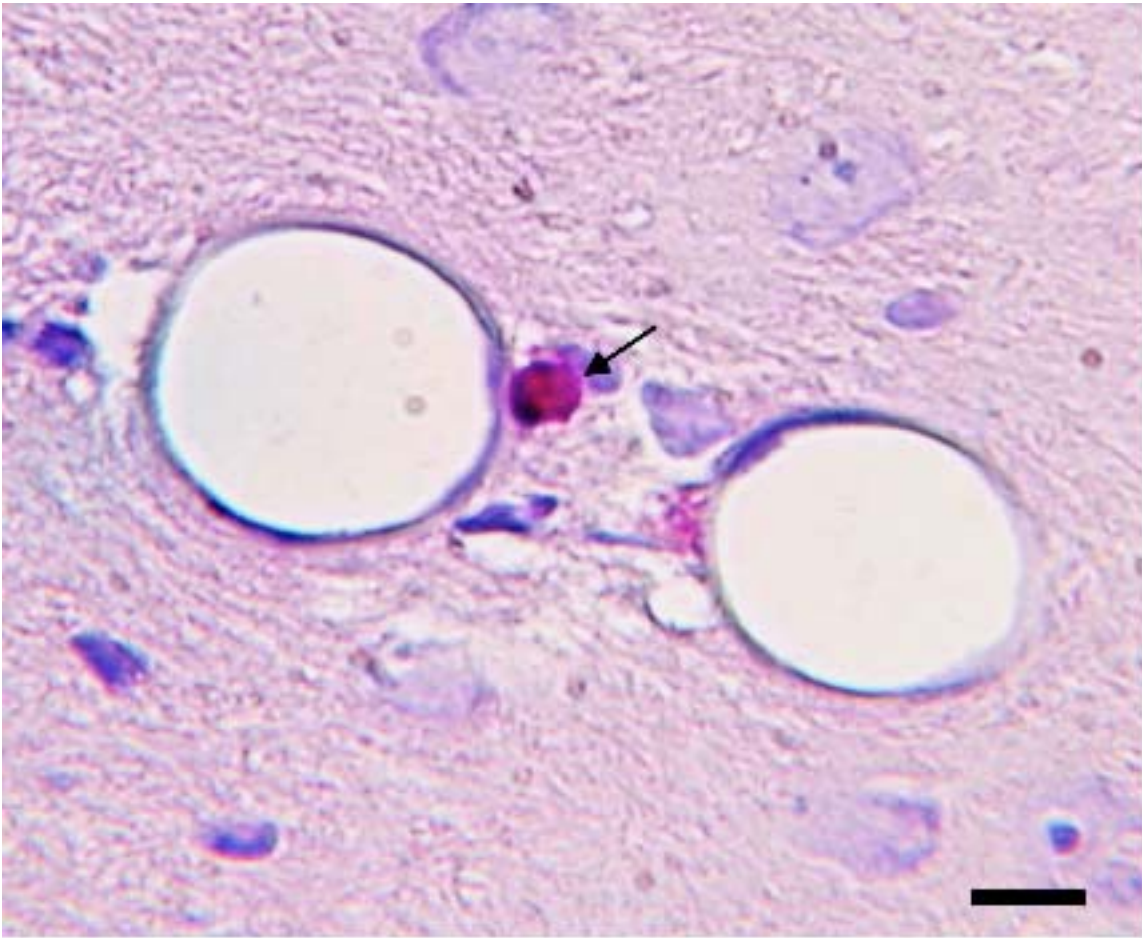


Abbildung 38: Schnitt aus dem Thalamus der Wüstenrennmaus. Der Pfeil zeigt auf einen Granulozyten, der das Endothel transmigriert hat (Esterase-Färbung, Maßstab = 10 μ m).

4 Diskussion

4.1 Experimentelles Modell

4.1.1 Verwendung eines Tiermodells

Der Großteil des heutigen Wissens über pathophysiologische Vorgänge bei zerebralen Insulten wie z.B. Ischämie oder Trauma stammt aus experimentellen Untersuchungen in unterschiedlichen Tiermodellen [11, 107]. Gründe, pathophysiologische Mechanismen in Tiermodellen zu untersuchen, sind die gute Standardisierbarkeit der Untersuchungsbedingungen sowie der auslösenden Faktoren und die Möglichkeit der Anpassung eines Modells an eine bestimmte Fragestellung. Untersuchungen beim Menschen sind aufgrund der großen Heterogenität der Vorgänge bezüglich Ätiologie, anatomischer Lokalisation und Ausprägung der Schädigung sehr schwer durchzuführen. Im Gegensatz zu experimentellen Bedingungen, wie Sie nur im Tierversuch möglich sind, erlauben die variablen Vorgänge beim Menschen nur geringe Aussagen über die pathophysiologischen Abläufe.

Auch *in vitro* Untersuchungen, Zellkulturen oder Gewebeschnitte werden häufig für bestimmte Fragestellungen angewandt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind jedoch nicht immer auf den Menschen übertragbar. Dies trifft vor allem auf komplex regulierte Systeme wie z.B. die Mikrozirkulation zu.

4.1.2 Auswahl des Versuchstiers

Für die Forschung an der zerebralen Ischämie oder dem Neurotrauma sind Nagetiere die am häufigsten verwendeten Versuchstiere. Durch Inzucht haben sie eine große Homogenität innerhalb der eigenen Spezies bei gleichzeitig hohem Grad an genetischen Homologien zu höheren Säugetieren. Die ethische Akzeptanz der Nutzung von Nagetieren ist im Vergleich zu Hunden, Katzen oder subhumanen Primaten größer. Durch mikrochirurgische Operationstechniken ist eine genaue Präparation möglich.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Mongolischen Wüstenrennmäusen durchgeführt (Ordnung: Nagetiere (Rodentia); Unterordnung: Mäuseverwandte (Myomorpha); Familie: Langschwanzmäuse (Muridae); Unterfamilie: Rennmäuse (Gerbillinae); Gattung: Sandmäuse (Merionus); Wissenschaftlicher Name: *Merionus unguiculatus*).

Dabei waren folgende Eigenschaften der Spezies von Vorteil:

- In verschiedenen Perfusionsstudien konnte gezeigt werden, dass bei Gerbils der *Circulus arteriosus Willisii* unvollständig ausgebildet ist. Sie besitzen keine *Aa. communicantes posteriores*, sondern lediglich kleine Arteriolen mit einem Durchmesser von max. 30 – 60 μm als Verbindung zwischen dem vorderen, durch die *Aa. carotides internae* versorgten, und dem hintere-

ren, vertebrovasilären Hirnkreislauf [65, 92, 93]. Aufgrund dieser anatomischen Besonderheit ist eine beinahe komplette Ischämie des Großhirns durch Okklusion beider Aa. carotides bei erhaltener Durchblutung des Hirnstamms möglich. So wurden Gerbils wiederholt in Untersuchungen zur globalen zerebralen Ischämie eingesetzt [60-62, 118, 119]. In Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe wurden Gerbils ebenfalls zur Beurteilung der zerebralen Mikrozirkulation bei globaler zerebraler Ischämie verwendet [90, 176], so dass eine gute Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Untersuchungen besteht.

- Weitere Vorteile sind die dünne Dura mater und der schmale Subarachnoidalraum der Tiere. Dies ermöglicht die Epifluoreszenzmikroskopie der Gefäße der Hirnoberfläche bei intakter Dura mater nach Entfernung der Schädelkalotte. Bei größeren Versuchstieren wie z.B. Ratten ist dies nicht möglich, so dass ein offenes oder sekundär geschlossenes Schädelfenster präpariert werden muss [32]. Diese Verfahren können allein durch die Präparation zu einer Schädigung der Gehirnoberfläche führen. So konnte nach Eröffnung der Dura mater bei der Ratte schon in der Kontrollphase eine Leukozytenaktivierung beobachtet werden [26]. Bei unserem Modell mit intakter Dura mater kam es lediglich nach unbeabsichtigter Berührung der Dura mater während der Präparation oder nach Auftreten kleiner Blutungen aus Duragefäßen zu einer Leukozytenaktivierung, so dass eine Aktivierung von Leukozyten in der Kontrollphase vor Bradykinin-Infusion als Ausschlusskriterium festgelegt und diese Tiere in die weiteren Untersuchungen nicht einbezogen wurden.

4.1.3 Anästhesie

Zur Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation war eine Narkotisierung der Versuchstiere über einen Zeitraum von ca. sechs Stunden von Beginn der Präparation bis zur Fixationsperfusion nötig. Die Durchführung einer maschinellen Beatmung ist bei Untersuchungen der Mikrozirkulation in Kleintieren von Nachteil, da regelmäßige Blutgasanalysen aufgrund des geringen Blutvolumens der Versuchstiere zu Störungen der Hämodynamik führen können.

Aus diesem Grund wurde für die vorliegenden Versuche ein volatiles Anästhetikum ausgewählt, wodurch eine Spontanatmung der Versuchstiere bei guter Steuerbarkeit der Narkosetiefe möglich war. Halothan wurde ausgewählt, da es relativ schnell an- und abflutet und einfach zu handhaben ist.

Ein Nachteil volatiler Anästhetika ist deren Beeinflussung mikrozirkulatorischer Parameter. Dies trifft z.B. auf die zerebrale Durchblutung aber auch die Leukozytenaktivierung zu.

So beschrieben König und Mitarbeiter eine Dilatation pialer Arterien bei Ratten nach lokaler Halothan-Gabe um 10 – 25 % im Vergleich zum Ausgangswert [78]. Verschiedene Untersuchungen beschrieben entsprechend diesen Ergebnissen eine Steigerung der Durchblutung unter Narkose mit Halothan und anderen volatilen Anästhetika wie zum Beispiel Isofluran [50, 83]. Hansen und Mitarbeiter

konnten zeigen, dass die Steigerung der Durchblutung durch Halothan vor allem den Neocortex betrifft [51].

Des Weiteren beschrieben Miletich und Mitarbeiter bereits 1976 einen Verlust der Autoregulation unter Narkose mit Halothan in der Ziege [108]. Dieses Phänomen wurde später ebenfalls für andere Spezies beschrieben, es gibt jedoch keine Daten für die Wüstenrennmaus [9, 115].

Neben der Beeinflussung der Vasomotorik wurde auch eine Einwirkung volatiler Anästhetika auf die Aktivierung von Leukozyten berichtet. Moudgil und Mitarbeiter beschrieben eine Hemmung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten durch Enfluran, Halothan, Methoxyfluran und Lachgas in vitro [117]. Auch im Rahmen von in vivo Experimenten wurde eine Reduktion der Leukozytenaktivierung gefunden [80, 110]. Dabei war das Ausmaß der verminderten Leukozytenaktivierung in den unterschiedlichen Untersuchungen für die einzelnen Anästhetika wechselnd. Im Gegensatz dazu konnten Erskine und James sowie Nunn und O'Morain keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten durch Halothan feststellen [33, 127]. Morisaki und Mitarbeiter beschrieben eine Induktion von Leukozyten-Endothel Interaktionen in der mesenterialen Mikrozirkulation der Ratte unter Halothan-Narkose, führten diese jedoch auf eine geringe Durchblutung des Mesenteriums zurück [114].

Insgesamt ist die genaue Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Mikrozirkulation bisher unklar und besonders im Hinblick auf die zerebrale Mikrozirkulation gibt es bisher wenige Daten. Bei der Untersuchung mikrozirkulatorischer Parameter ist jedoch ein möglicher Einfluss der Narkose zu berücksichtigen.

4.1.4 Bradykinin-Infusion

Der Mediator Bradykinin wird nach seiner Freisetzung aus Kininogen innerhalb kurzer Zeit durch unterschiedliche Proteasen gespalten (siehe Abbildung 39).

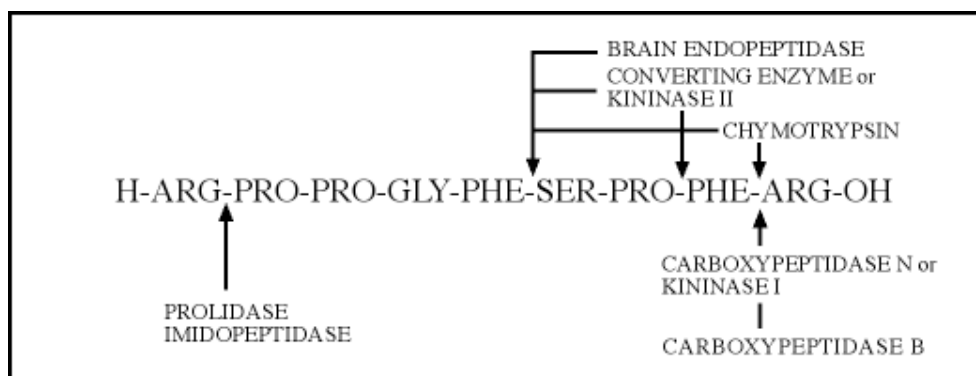


Abbildung 39: Primäre Struktur von Bradykinin und mögliche Angriffspunkte proteolytischer Enzyme (Modifiziert nach Regoli und Barabe [141]).

Unter anderem bedingt durch die zahlreichen Abbauvorgänge ergibt sich für Bradykinin eine sehr kurze Halbwertszeit. Kariya und Mitarbeiter beschrieben nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Bradykinin bei der Ratte eine Halbwertszeit von $26,6 \pm 3,6$ Sekunden [68]. Daten zur Halbwertszeit von Bradykinin im Plasma sind bisher nicht verfügbar, es ist jedoch von einer ähnlich kurzen Halbwertszeit auszugehen.

Auf Grund der kurzen Halbwertszeit und methodischer Probleme ist die Bestimmung physiologischer Bradykinin-Konzentrationen schwierig. Duncan und Mitarbeiter entwickelten eine Methode basierend auf einem Radioimmunoassay zur Bestimmung von Bradykinin-Konzentrationen und fanden eine Konzentration von < 1 fmol/ml im arteriellen und $2,7 \pm 0,9$ fmol/ml im venösen Blut des Menschen [29]. Kamiya und Mitarbeiter untersuchten den Anstieg der Bradykinin-Konzentration im Gewebe und im Plasma nach 3-stündiger zerebraler Ischämie. In Ihren Untersuchungen fanden sich Werte von maximal $486,7 \pm 136,1$ pg/ml (ca. 460 fmol/ml) Bradykinin im Plasma 30 Minuten nach Ende der Ischämie [66].

In den vorliegenden Versuchen erfolgte die intraarterielle Bradykinin-Infusion in verschiedenen Konzentrationen zur Analyse einer möglichen Dosis-Wirkungsbeziehung und zur Festlegung der effektivsten Bradykinin-Konzentration. Als niedrigste Dosis wurde die Applikation von 2 ml einer 10^{-4} molaren Lösung über 30 Minuten gewählt. Dabei ist durch einen Verdünnungseffekt von einer erheblich niedrigeren Konzentration am Wirkungsort auszugehen. So konnten Unterberg und Mitarbeiter bei Untersuchungen an Katzen nach intraarterieller Infusion einer 10^{-3} molaren Lösung mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min eine Kinin-Konzentration von $4 - 6 \times 10^{-6}$ M im Sinus sagittalis superior feststellen [180].

4.2 Untersuchung der Mikrozirkulation

Die Auswirkung einer lokalen Bradykinin-Infusion auf die zerebrale Mikrozirkulation wurde durch die Intravitalmikroskopie untersucht. Bisher gab es nur indirekte Hinweise für eine Rolle von Bradykinin bei der Initiierung von Leukozyten- und Thrombozyten-Endothel Interaktionen in der zerebralen Mikrozirkulation. Die Intravitalmikroskopie wurde zur Untersuchung der Fragestellung gewählt, da diese Methode eine Beurteilung verschiedener Parameter zur gleichen Zeit und deren dynamische Entwicklung über einen bestimmten Zeitraum ermöglicht.

So kann die quantitative Analyse von Mikrovasomotorik, Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen und der funktionellen Kapillardichte sowie die semiquantitative Analyse der lokalen Durchblutung und die qualitative Bestimmung der Permeabilität in zeitlichen Verlauf bestimmt werden. Von den einzelnen Schritten der Leukozyten-Endothelinteraktion mit Margination, Rollen, Adhärenz und Transmigration ist durch die Intravitalmikroskopie in der zerebralen Mikrozirkulation eine Differenzierung rollender und adhärenter Leukozyten möglich, jedoch bezogen auf die zerebrale Mikrozirkulation nicht die Analyse der Leukozytenmigration. Indirekt können emigrierte

Leukozyten durch die Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität nachgewiesen werden [105]. Histologisch ist ebenfalls der direkte Nachweis von Leukozyten im Hirnparenchym möglich [42, 48]. Die histologische Untersuchung der Mikrozirkulation mit Verwendung von Hirnschnitten erlaubt allerdings keine Beurteilung dynamischer Veränderungen, weswegen wir uns primär für die Intravitalmikroskopie entschieden und die Histologie zusätzlich zur Beurteilung des Anteils extravasierter Leukozyten nach Versuchsende angewandt haben.

Mikroskopische Beobachtungen der Hirnoberfläche sind grundsätzlich mit Durch- und Auflicht möglich. Pawlik und Mitarbeiter untersuchten 1981 kortikale Kapillaren in Transilluminationstechnik [131], Yamakawa und Mitarbeiter stellten 1987 ihre Arbeiten zum Verhalten weißer Blutzellen bei Katzen mit hämorrhagischer Hypotension, ebenfalls in Durchlichttechnik, vor [194]. Diese Technik machte jedoch den Einsatz einer mikrochirurgisch in den Kortex vorgeschobenen Lichtquelle nötig, wodurch es zu einer Verletzung von Hirnparenchym mit Störung der Blut-Hirnschranke, Ödembildung, Blutung und lokaler Wärmeproduktion kam. Diese Komplikationen führen zu einer Beeinträchtigung der Untersuchungsergebnisse und treten bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Epiilluminationmikroskopie nicht auf.

Eine weitere Technik, die eine in vivo Untersuchung der Mikrozirkulation ermöglicht, ist die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Zur in vivo Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation wurde sie erstmals 1989 von Villringer et al. bei Ratten angewandt [181]. Die konfokale Laser-Scanning-Microscopie hat im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie eine bessere räumliche Auflösung sowie eine größere Eindringtiefe mit bis zu 300 μm in vivo. Dies wurde von Lorenzl und Mitarbeitern bei der Pneumokokkenmeningitis bei Ratten gezeigt [97]. Auf der anderen Seite bietet diese Methode im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie ein geringeres zeitliches Auflösungsvermögen, da die durchschnittliche Aquirierung eines zweidimensionalen Bilds bei voller Auflösung eine Sekunde dauert. Eine Reduktion der Anzahl der Bildpunkte kann diesen Zeitraum auf 1/16 Sekunde verringern, ermöglicht jedoch nicht die Beurteilung der Dynamik der Leukozyten- oder Thrombozyten-Endothelinteraktion. Deswegen wurde der konventionellen Lichtmikroskopie der Vorzug gegeben.

Zur intravitalmikroskopischen Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation ist die Präparation eines Schädelfensters nötig. Bei der Präparation eines offenen Schädelfensters bei kleinen Versuchstieren ist die Herniation von Hirngewebe nach Eröffnung der Kalotte und Inzision der Dura mater eine bedeutende Komplikation.

Infolgedessen wird für diese Experimente häufig ein geschlossenes Schädelfenster angewandt. Dabei wird der eröffnete Fensterbereich durch ein Deckglas mit Zahnzement oder Histoacryl versiegelt [113]. Aufgrund des geschlossenen Systems ist eine Messung des intrakraniellen Drucks möglich.

Uhl und Mitarbeiter konnten in diesem Modell die Liquorhomöostase analysieren und durch Superfusion der exponierten Hirnoberfläche mit dem Entzündungsmediator PAF dessen Auswirkung auf die Mikrozirkulation untersuchen [177, 178]. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass es durch Eröffnung

der Dura mater schon nach kurzer Zeit zu einer Schädigung der Blut-Hirnschranke kommen kann [129]. Eine Senkung des Liquordrucks auf 0 mmHg über 10 Minuten kann bereits zu einer Eröffnung der Blut-Hirnschranke führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das geschlossene Schädelfenster beim Gerbil verwendet, welches ermöglicht, derart aufwendige Präparationen zu vermeiden. Die Dura mater blieb während des gesamten Untersuchungszeitraums geschlossen, eine Herniation des Gehirns fand nicht statt. In Folge dessen blieb der Subarachnoidalraum intakt, wodurch auf eine Superfusion des Gehirns mit künstlichem Liquor verzichtet werden konnte. Ferner mussten die Blutgefäße der Dura mater nicht durchtrennt oder verodet werden. Im Gegensatz zu Modellen mit Entfernung der Dura mater konnte beim geschlossenen Schädelfenster beim Gerbil eine Aktivierung von Leukozyten- oder Thrombozyten-Endothelinteraktionen durch die Präparation vermieden werden.

Zur Beurteilung des Intravasalraums wurde hochmolekulares, Texas-Red markiertes Dextran mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass hochmolekulares Dextran nicht zu einer Veränderung der Blutviskosität führt, jedoch hemmende Eigenschaften auf Leukozyten-Endothelinteraktionen besitzt und die funktionelle Kapillardichte verbessern kann [166, 167]. Diese Effekte müssen bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden, führen jedoch eher zu einer Unterschätzung der Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten, als zu einer Überschätzung. Die Emmissionsintensität des markierten Plasmas blieb nach einmaliger Gabe des Farbstoffs zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen während des gesamten Untersuchungszeitraums ausreichend hoch. Eine Extravasation des Farbstoffs ins Hirnparenchym war auch am Ende des Experiments nicht zu beobachten.

Die Fluoreszenzmarkierung von Leukozyten wurde *in vivo* durch die intravenöse Injektion des Farbstoffs Rhodamin 6G erreicht. Eine *ex vivo* Markierung der Leukozyten führt zu dem erheblich höheren Risiko einer extrakorporalen Aktivierung der Zellen mit Expression von Integrinen [49] und Veränderung der rheologischen Eigenschaften [75, 123]. Rhodamin 6G wurde zu jedem Beobachtungzeitpunkt als Bolus injiziert, wodurch von einer ausreichenden Färbung des Großteils aller Leukozyten zu den einzelnen Messzeitpunkten auszugehen ist [6].

Die Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten erfolgte *ex vivo* durch den Farbstoff CFDA-SE. Ein Farbstoff, welcher nach intravenöser Injektion zu einer spezifischen Färbung von Thrombozyten führt, ist bislang nicht verfügbar. Ishikawa und Mitarbeiter untersuchten das Verhalten von Thrombozyten in der zerebralen Mikrozirkulation nach intravenöser Injektion von Rhodamin 6G [59]. Da dieser Farbstoff vor allem zu einer Färbung der Leukozyten führt und diese aufgrund ihres größeren Zellvolumens Thrombozyten überstrahlen können, war eine quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelinteraktionen und eine Unterscheidung zwischen Thrombozyten und Leukozyten in diesem Modell nicht möglich. Khandoga und Mitarbeiter untersuchten Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der Mikrozirkulation der Leber nach *ex vivo* Färbung der Thrombozyten mit Rhodamin 6G [73]. Eine gleichzeitige Beurteilung von Leukozyten- und Thrombozy-

ten-Endothelinteraktionen konnte nicht erfolgen und durch einen schnellen Abfall der Emissionsintensität der gefärbten Thrombozyten waren die Untersuchungszeiträume stark eingeschränkt. Im Gegensatz hierzu ermöglicht die ex vivo Färbung von Thrombozyten mit CFDA-SE eine Analyse der Thrombozyten-Endothelinteraktionen über mehrere Stunden. Außerdem können die CFDA-SE-gefärbten Thrombozyten leicht von Rhodamin 6G-gefärbten Leukozyten unterschieden werden. Die Methode wurde zuerst von Manegold und Mitarbeitern zur Beurteilung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der Rückenhautkammer der Maus beschrieben [101], das Protokoll der Thrombozyten Färbung führte jedoch bei den Thrombozyten des Gerbil zu einer Zellaktivierung. Nach Modifikation des Protokolls konnte die Färbung der Thrombozyten ohne Aktivierung der Zellen erreicht werden. Die Beurteilung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen war während des gesamten Versuchsablaufs ohne merkbare Verringerung der Emissionsintensität möglich.

Um phototoxische Effekte und das Ausbleichen der Farbstoffe zu reduzieren, wurde die Belichtungszeit auf 60 Sekunden pro Messgebiet und Messzeitpunkt verkürzt [140]. Durch die SIT-Restlichtkamera in Verbindung mit einem 25 x Salzwasserimmersions-Objektiv war die Verwendung von Erregerlicht geringer Intensität möglich. Die einzelnen Parameter wurden offline analysiert. Durch den computergesteuerten Mikrometertisch konnten die regions of interest zuverlässig wieder gefunden werden, ohne eine unnötige Lichtexposition hervorzurufen. Eine Schädigung der Blut-Hirnschranke, wie sie durch phototoxische Effekte beschrieben wurde [109], konnte in keinem Versuch nachgewiesen werden.

Aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe war es nicht möglich, in größeren Venolen ($>50 \mu\text{m}$) alle Zellen zu erfassen, die mit dem Endothel interagierten, ebenso gelang die simultane Darstellung der gesamten Endotheloberfläche nicht. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der interagierenden Zellen als Anzahl pro $100 \mu\text{m}$ langem Gefäßsegment und Minute angegeben und nicht als Zellen pro Gefäßoberfläche wie in anderen Publikationen beschrieben. Ebenfalls konnten aus diesem Grund der Leukozytenflux und der Mikroleukokrit nicht berechnet werden.

4.2.1 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Eine große Anzahl verschiedener Ursachen führt zu einer Aktivierung von Leukozyten in der zerebralen Mikrozirkulation mit darauf folgender Extravasation der Zellen in das Parenchym. Dies trifft vorwiegend auf Entzündungsreaktionen im Rahmen von Infektionen zur Abwehr der Krankheitserreger, wie z.B. bei einer Meningitis zu. Aber auch andere Mechanismen wie z.B. eine zerebrale Ischämie oder ein Schädel-Hirn Trauma führen zu einer Entzündungsreaktion mit einer daraus resultierenden Aktivierung von Leukozyten. Die aktivierten Leukozyten können im Hirnparenchym durch Freisetzung freier Radikale oder Proteasen nicht nur an der Abwehr von Erregern teilnehmen oder nekrotisches Gewebe abräumen sondern auch gesundes Gewebe zerstören [30, 81, 87, 154]. Zur Extravasation der Leukozyten in das Parenchym ist eine Kaskade von vier

Schritten nötig. Dazu gehören die Margination, das Rollen, die feste Adhärenz und die Transmigration. Margination bedeutet, dass der Leukozyt den Zentralstrom innerhalb des Gefäßes verlässt und in der Nähe des Endothels fließt. Auf Grund des größeren Durchmessers im Vergleich zu anderen Blutzellen tendieren Leukozyten dazu, bei höheren Fließgeschwindigkeiten im Zentralstrom des Gefäßes zu fließen. Bei niedrigen Geschwindigkeiten kommt es zu einer Agglutination von Erythrozyten, deren Größe nimmt zu und Leukozyten werden an den Rand des Gefäßes verdrängt [125]. Dies ermöglicht einen Kontakt der Leukozyten mit dem Gefäßendothel. Durch verschiedene Adhäsionsmoleküle wird nun ein Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel ermöglicht, wobei den Selektinen eine besondere Bedeutung zukommt. Eine Übersicht über die beteiligten Rezeptoren gibt Abbildung 40.

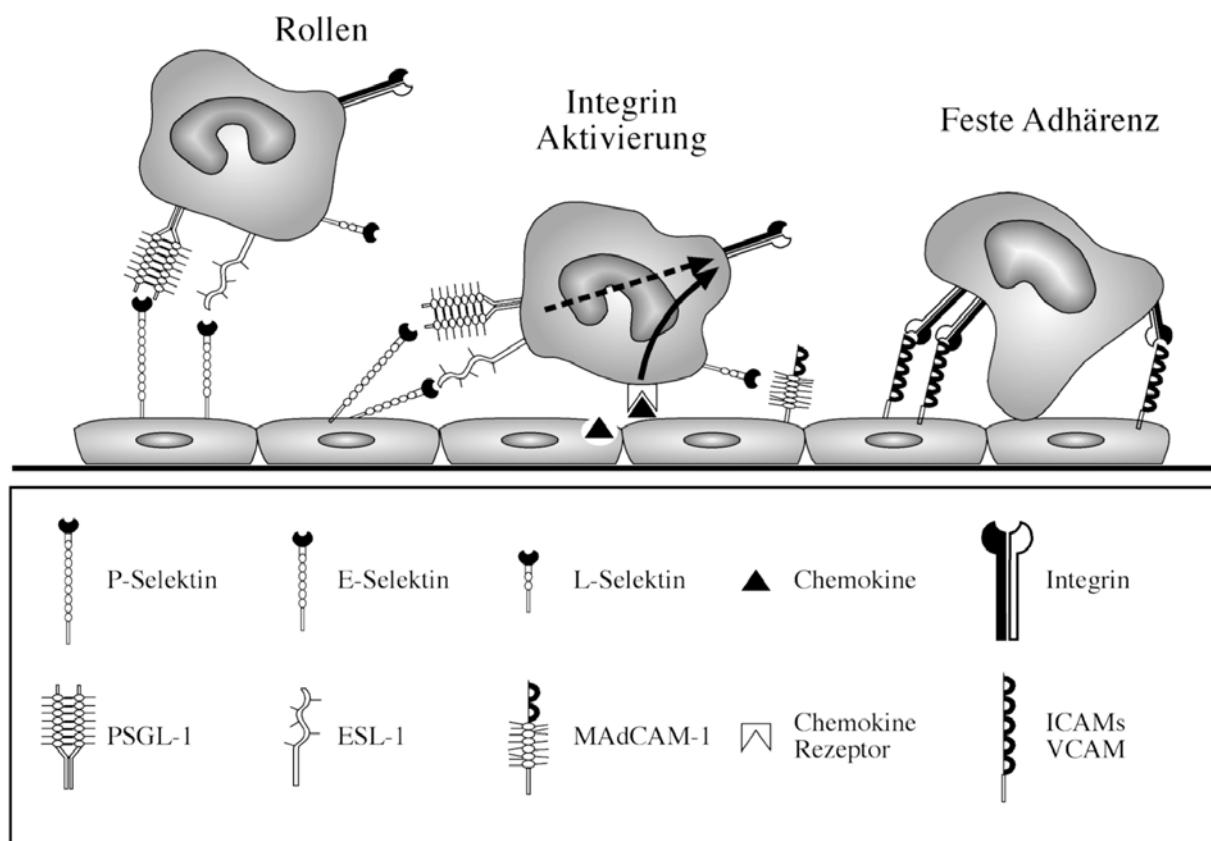


Abbildung 40: Die Emigration von Leukozyten in das Gewebe wird durch eine Kaskade multipler molekularer Interaktionen kontrolliert. Die Selektine initiieren das Anheften der Leukozyten am Gefäßendothel. Dies ermöglicht das Entlangrollen der Leukozyten am Endothel, wodurch Leukozyten in der Lage sind, Chemokine auf der Endotheloberfläche zu registrieren. Daraus resultiert eine Aktivierung der Integrin-Rezeptoren auf Leukozyten, welche, durch Bindung an Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, eine feste Adhärenz der Rezeptoren am Endothel ermöglichen. Die Adhäsion der Leukozyten ist die Voraussetzung für die Emigration der Zellen in das Parenchym. Zahlreiche Hinweise deuten auf eine Aktivierung der Integrin-Rezeptoren durch Selektine neben den Chemokinen hin. (Modifiziert nach Ebnert und Vestweber [30])

Während des Rollens wirken verschiedene Moleküle wie z.B. TNF, IL-1 β , PAF, Bradykinin und Endothelin auf die Leukozyten ein [1, 165]. Diese Substanzen werden vom Parenchym und vom

Gefäßendothel synthetisiert und freigesetzt und führen zu einer Konformationsveränderung verschiedener Oberflächenmoleküle der Leukozyten, wie zum Beispiel den Integrinen, wodurch diese Oberflächenmoleküle in der Lage sind, Endothelrezeptoren zu binden. Durch Bindung der Integrine an Moleküle der Ig-Superfamilie kommt eine feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel zustande. Mit Hilfe dieser Bindung wird dem Leukozyten ermöglicht, durch die Endothelschicht hindurch zu treten und in das Gewebe auszuwandern [164].

4.2.2 Thrombozyten-Endothelinteraktionen

Die bekannteste Funktion der Thrombozyten besteht in der Aufrechterhaltung der natürlichen Blutzirkulation. Dazu tragen sie bei, indem sie die Unversehrtheit der Gefäße bewahren und nach Verletzungen von Gefäßen an der Hämostase beteiligt sind. Thrombozyten reagieren sehr schnell auf Veränderungen am Gefäßendothel. Kommt es zum Beispiel zu einer Offenlegung des Subendothels, heften sich einzelne Thrombozyten fest an den Bereich der Läsion. Weitere Thrombozyten interagieren mit den bereits aktivierten und adhärenen Thrombozyten, wodurch ein Thrombus entsteht. Die initiale Interaktion der Thrombozyten mit dem Gefäßendothel wird als Adhäsion bezeichnet, die weitere Vergrößerung des Thrombus durch Thrombozyten-Thrombozyten Interaktionen als Aggregation [151].

Für die Adhäsion von Thrombozyten an der Gefäßwand sind zwei Voraussetzungen nötig: Auf der einen Seite führen Agonisten, welche im Rahmen der Läsion freigesetzt werden, zu einer Aktivierung von Thrombozyten. Dadurch sind diese in der Lage, mit Adhäsionsmolekülen zu interagieren. Auf der anderen Seite reagieren aktivierte Thrombozyten nur mit Molekülen, die bei Gefäßwandveränderungen exponiert werden. Dies ermöglicht eine Kontrolle der Thrombusbildung.

Auf molekularer Ebene kommen verschiedene Komponenten des Subendothels, wie Kollagen, Fibronektin oder von Willebrand Faktor, für die Adhäsion der Thrombozyten in Betracht. Die Adhäsion erfolgt dabei durch spezifische Membranrezeptoren (siehe Abbildung 41).

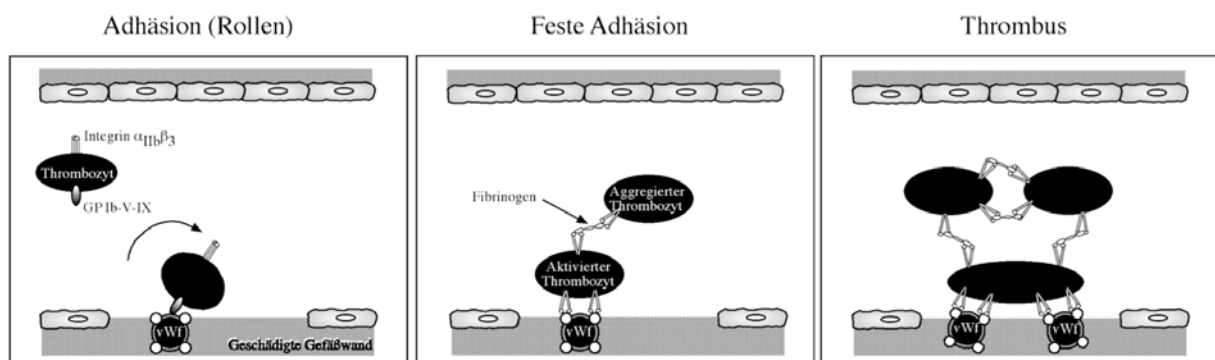


Abbildung 41: Thrombozytenadhäsion und Thrombusbildung. Die Thrombozytenadhäsion an der geschädigten Gefäßwand wird durch das Rollen der Thrombozyten am Subendothel initiiert. Dies geschieht durch die Bindung des Thrombozytenrezeptors GP Ib-V-X am von Willebrand-Faktor (vWF) (linke Abbildung). Nach Aktivierung der Thrombozyten durch diese Bindung und verschiedene Aktivierungsmediatoren (ADP, Thrombin etc.) kommt es zu einer Konformationsveränderung des In-

tegrin-Rezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$, welcher eine feste Adhäsion an vWF ermöglicht (mittlere Abbildung). Durch Bindung des Integrin-Rezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ an Fibrinogen entsteht ein wachsender Thrombus (rechte Abbildung).

Neben der klassischen Interaktion von Thrombozyten mit dem Subendothel und Ihrer Bedeutung bei der Kontrolle der Hämostase gibt es zunehmend Hinweise auf eine Rolle der Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen. Nach Aktivierung von Endothelzellen im Rahmen einer Entzündung kommt es dabei zu Thrombozyten-Endothelinteraktionen. Vermittelt durch endotheliales P-Selectin rollen die Thrombozyten dabei initial entlang des Endothels. [38, 103]. In einer Studie zur Untersuchung der Endotoxin-induzierten Thrombozyten-Endothelinteraktion an Ratten konnten Katayama und Mitarbeiter zeigen, dass die Bindung an endotheliales P-Selectin durch den Thrombozytenrezeptor GP Iba erfolgt [70]. Nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer festen Adhärenz der Thrombozyten an den Endothelzellen. Ein möglicher Mechanismus ist dabei die Bindung von Fibrinogen an den endothelialen Rezeptor ICAM-1 mit der darauf folgenden Bindung der Thrombozyten an Fibrinogen [73, 104]. Die aktivierten Thrombozyten können daraufhin durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Eikosanoiden, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu einer Gewebsschädigung und zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen [21, 37, 128, 156, 187].

4.2.3 Funktionelle Kapillardichte

Neben einer direkten Schädigung des Gehirnparenchyms durch die Freisetzung von freien Radikalen oder proteolytischen Enzymen, können Leukozyten nach ihrer Aktivierung auch das Lumen von Kapillargefäßen verschließen und dadurch zu einer Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen führen.

Ames und Mitarbeiter beschrieben 1968 eine Okklusion zahlreicher Kapillaren während der Reperfusion nach zerebraler Ischämie [3]. Bei diesen Versuchen wurden in verschiedenen Versuchsgruppen nach 2,5, 5, 7,5, 10 und 15 Minuten Ischämie die Aa. carotides kanüliert und Tinte injiziert. Nach histologischer Aufbereitung wurden in den Hirnschnitten dunkle, also perfundierte, Areale mit hellen Arealen, in welche keine Tinte gelangt war, verglichen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Dauer der Ischämie der Anteil der nicht perfundierten Areale deutlich zunahm. Wurde das Gehirn vor Induktion der Ischämie mit Kochsalzlösung perfundiert, zeigte sich kein Perfusionsausfall in der histologischen Untersuchung. Aus diesem Grund wurden Blutzellen für dieses Phänomen verantwortlich gemacht, welches im Folgenden „no-reflow“ Phänomen genannt wurde.

Neben der genannten Hypothese kommen als Ursache für die Kapillarokklusion auch eine Verminderung der Kapillardurchmesser durch Schwellung von Endothelzellen, eine Bildung von Protrusionen der Endothelzellmembranen oder eine Schwellung von Gliazellen in Betracht [14, 71]. Die Ergebnisse von Ames und Mitarbeitern wurden teilweise kontrovers diskutiert. De la Torre und Mitarbeiter wiederholten aus diesem Grund die Versuche und zeigten, dass nur die Infusion der Tinte in die Karotiden

nach Thorakotomie Perfusionsdefekte erzeugt, nicht jedoch die intravenöse Gabe des Farbstoffs in vivo [19]. Daraus schlossen die Autoren, dass es sich beim „no-reflow“ Phänomen um ein methodisches Artefakt handeln müsse.

Eine Untersuchung von Theilen und Mitarbeitern zeigte nach 15-minütiger globaler Ischämie bei Ratten in der Reperfusionphase eine normale Perfusion aller Kapillaren, nach 30 Minuten war die Dichte der perfundierten Kapillaren in einigen Arealen reduziert [174]. Mori und Mitarbeiter untersuchten die Rolle polymorphkerniger Leukozyten in der zerebralen Mikrozirkulation nach fokaler zerebraler Ischämie [112]. Die Autoren fanden eine Reduktion der kapillären Durchblutung in der Reperfusionphase, welche sich durch Hemmung der Leukozyten-Endothelinteraktionen durch den monoklonalen CD18-Antikörper IB4 signifikant verbessern lies und schlossen daraus auf eine Beteiligung der Leukozyten am „no-reflow“ Phänomen.

Insgesamt scheint das „no-reflow“ Phänomen von der Dauer oder Tiefe der Ischämie abhängig zu sein. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Beurteilung der kapillären Durchblutung durch die Bestimmung der funktionellen Kapillardichte zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Die Intravitalmikroskopie ermöglicht dabei die Messung der Kapillardichte zu beliebigen Zeitpunkten innerhalb eines Experiments und damit eine Beurteilung dynamischer Veränderungen dieses Parameters.

4.2.4 Quantifizierung der mikrovaskulären Durchblutung

Zur Quantifizierung der Hirndurchblutung wurde eine Reihe von Methoden im Tierversuch angewandt. Bei den Indikator-Auswaschmethoden, wie z.B. der Wasserstoff- oder Heliumclearance, erfolgt die Bestimmung der regionalen zerebralen Durchblutung (rCBF) durch Implantation von Indikatormesssonden [5, 35]. Dabei wird nach Applikation eines Indikators und Erreichen einer gewünschten Steady-state Konzentration dieser, abhängig von der Durchblutung, aus dem Hirngewebe ausgewaschen. Die Bestimmung der Kinetik der Konzentrationsänderung durch die Indikatormesssonde ermöglicht die quantitative Berechnung der Durchblutung. Hierdurch werden multiple Messungen der regionalen Durchblutung möglich, es ist jedoch die unter Umständen verletzende Platzierung einer Sonde nötig. Durch die ¹⁴C-Autoradiographie [64, 152] oder durch Injektion von radioaktiven [55] oder fluoreszierenden [55] Mikrosphären ist die gleichzeitige Messung der regionalen Durchblutung verschiedener Hirnareale möglich. Diese Methoden zeichnen sich durch ihre hohe Standardisierung aus und ergeben absolute Werte (z.B. ml/100g*min). Allerdings ist zur Durchführung der Versuche das Töten des Versuchstieres für die Aufbereitung des Gehirns nötig.

Aufgrund des geringen Gehirnvolumens von Nagetieren wie dem Gerbil ist der Einsatz von Magnetresonanztomographie, Positronenresonanztomographie [85] oder der ¹³³Xenon-Clearance [28] mit externer Messung der radioaktiven Strahlung so gut wie unmöglich.

4.2.4.1 Laser-Doppler-Fluxmetrie

Die Laser-Doppler-Fluxmetrie erlaubt die kontinuierliche Bestimmung der regionalen Durchblutung mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung. Für die zerebrale Mikrozirkulation wurde dies erstmals von Stern 1975 [168] und von Williams und Mitarbeitern 1980 [191] gezeigt. Dabei ist einer der Vorteile, dass die Messsonde auf der Dura mater bzw. der Schädelkalotte platziert werden kann und somit das Hirnparenchym nicht verletzt oder irritiert. Das Messvolumen bezogen auf das Hirnparenchym beträgt etwa 1 mm^3 bei einer maximalen Eindringtiefe des Lasers von etwa 1,5 mm. Die Untersuchungen beschränken sich dadurch wie bei der Intravitalmikroskopie auf die Hirnoberfläche. Eine Veränderung der Durchblutung durch die Messung tritt nicht auf. Die Anwendung der Methode ist sehr einfach, es ist jedoch beim Aufbringen der Sonde darauf zu achten, dass sich keine größeren Arteriolen oder Venolen im Messfeld befinden. Borgos berichtete, dass im Hirnparenchym das physikalische Doppler-Prinzip bei Untersuchungen mit dem Laser nur für Gefäße mit weniger als $200 \mu\text{m}$ Durchmesser gültig ist [8].

Nachteile der Methode sind das Fehlen genauer Kenntnisse über das Messvolumen des Parenchyms, die Abhängigkeit des Signals von den optischen Gewebeeigenschaften (z.B. Zelldichte, Wasser- oder Cytochromgehalt), Messfehler durch geringe räumliche Veränderungen und Unklarheit, von welchen Gefäßen der Mikrozirkulation das Signal ausgeht. Eine quantitative Bestimmung der Durchblutung ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Es wurde jedoch eine enge Korrelation des (relativen) LDF-Messwerts mit der durch Autoradiographie mit ^{14}C -Jodantipyrin quantitativ bestimmten Durchblutung des Gehirns von Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie [25] sowie der radioaktiven Mikrosphärenmethode gefunden [74].

4.2.4.2 Arterio-venöse Transitzeit

Auch in der Intravitalmikroskopie ist eine Beurteilung der regionalen Hirndurchblutung auf mikrovaskulärer Ebene möglich. So kann durch Bestimmung der Gefäßdurchmesser und der Strömungsgeschwindigkeit von roten Blutkörperchen die Perfusion eines Gefäßes quantitativ erfasst werden. Die Untersuchung der funktionellen Kapillardichte ermöglicht die Beurteilung der nutritiven Versorgung des Gewebes [126]. Wie bereits erwähnt, war in den vorliegenden Versuchen die Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten nicht möglich. Ersatzweise ist die Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit der im axialen Blutstrom fließenden Leukozyten zur Ermittlung der Durchblutung möglich, war jedoch ebenfalls in den vorliegenden Versuchen nicht durchführbar. Dass diese Methoden nicht zum Einsatz kommen konnten, liegt daran, dass die Geschwindigkeit des Blutes in den pialen Arteriolen und Venolen so hoch ist, dass eine Messung mit dem vorhandenen Auswertesystem und somit auch die zeitliche Korrelationsmethode – Dual-slit – nach Wayland und Johnson per Videodensitometrie nicht durchgeführt werden konnte [186].

Zusätzlich zur Laser-Doppler-Fluxmetrie wurde in den vorliegenden Versuchen zur Bestimmung der Durchblutung des Kortex die arterio-venöse Transitzeit (AVTT) ermittelt. Diese Methode erlaubt keine Aussage über absolute Durchblutungswerte, ermöglicht aber eine Aussage über Durchblutungsveränderungen im Vergleich zu einem Ausgangswert. Zur Bestimmung der AVTT wurde ein Farbstoffbolus (Rhodamin 6G) injiziert. Aufgrund der hohen Lipophilie und des geringen Molekulargewichts des Farbstoffes kam es auch nach mehrmaliger Applikation nur zu einem geringen Anstieg der Strahlungsintensität im Hintergrund. Dadurch waren wiederholte Messungen möglich. Die Werte der AVTT lagen, wie bereits von Rovainen und Mitarbeitern [150] beschrieben, bei 0,6 Sekunden. Vorteile der Methode sind u.a. die Unabhängigkeit des Ergebnisses von der Menge, Art und Injektionsgeschwindigkeit des Farbstoffbolus. Allerdings steht eine Validierung der Methode im Vergleich zu einer Referenzmethode zur Quantifizierung der Durchblutung noch aus.

4.3 Histologie

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Beurteilung einer Auswanderung aktivierter Leukozyten in das Gehirnparenchym in der Intravitalmikroskopie wählten wir zur Quantifizierung intraparenchymaler Leukozyten die Histologie aus. Dabei erfolgte die Färbung der einzelnen Schnitte durch Naphthol AS-D Chloracetat. Dabei handelt es sich um eine histochemische Reaktion, bei der eine zelleigene Esterase Naphthol AS-D Chloracetat zu einer Naphtolverbindung hydrolytisch spaltet. Diese Naphtolverbindung reagiert mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen rotviolettten Azofarbstoff. Die Esterase wird spezifisch in Knochenmarkszellen exprimiert und färbt dadurch vorwiegend neutrophile Granulozyten an. Es kommt zu keiner Färbung von Knochenmarksstammzellen, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Plasmazellen, Megakaryozyten, Erythrozyten oder Erythrozytenvorläuferzellen. Allerdings zeigen auch Histiozyten und Makrophagen eine starke Esterase-Aktivität. Ein weiterer Vorteil der Methode ist ihre Anwendungsmöglichkeit bei unterschiedlichen Spezies [111]. Aufgrund der einfachen Handhabung und der hohen Spezifität wird diese Methode routinemäßig in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen angewandt [86].

Eine immunhistochemische Färbung kam in den vorliegenden Versuchen nicht in Betracht, da für den Gerbil keine spezifischen Antikörper verfügbar waren.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Thrombozytenfunktion

4.4.1.1 *Thrombozytenfunktion in vitro*

Zur Färbung der Thrombozyten ist es nötig, diese aus dem Plasma zu isolieren, da andernfalls sämtliche Zellen des gewonnenen Plasmas mit dem ausgewählten Farbstoff gefärbt werden würden. Aufgrund der leichten Aktivierbarkeit von Thrombozyten ist es schwierig, eine Aktivierung während der Isolation und Färbung der Zellen zu vermeiden und dabei eine spätere Aktivierbarkeit aufrecht zu erhalten [199].

Der Einfluss der Isolierung und Färbung auf die Funktion der Thrombozyten wurde *in vitro* durch die FACS Analyse untersucht. Dabei wurde die Aktivierbarkeit durch die Agonisten ADP und humanes Thrombin überprüft. Dabei gilt ADP als schwacher Agonist und Thrombin als starker Agonist. Die FACS Analyse ermöglicht dabei die Beurteilung der Formveränderung der Thrombozyten während der Aktivierung, der Aggregation und der Sekretion unterschiedlicher Granula im Rahmen der Aktivierung (Gemessen am Abfall des Zellvolumens) [57]. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Thrombozyten durch Isolation und Färbung nicht aktiviert wurden und die gefärbten Thrombozyten sowohl durch Stimulierung mit ADP als auch Thrombin Aggregate formen konnten.

4.4.1.2 *Thrombozytenfunktion in vivo*

Neben der *in vitro* Untersuchung der Thrombozytenfunktion nach Stimulation mit den Agonisten ADP und Thrombin wurde die Funktion *in vivo* intravitalmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Modell der Photothrombose verwendet. Dabei erfolgt die Initiierung der Thrombose durch Beleuchtung eines Gefäßes nach systemischer Injektion eines photosensibilisierenden Farbstoffes. Die Methode wurde zum ersten Mal 1977 von Rosenblum und El-Sabban beschrieben [149]. Diese zeigten in zerebralen Gefäßen der Maus eine Thrombusbildung nach der Injektion von Natrium-Fluoreszein. Die Thrombozytenaggregate traten dabei nur in den beleuchteten Arealen auf. Elektronenmikroskopisch fand sich ein geschädigtes Gefäßendothel sowie Aggregate die vorwiegend aus Thrombozyten verschiedener Aktivierungsstufen bestanden. Verschiedene Arbeitsgruppen verwendeten dieses Modell mit unterschiedlichen photosensibilisierenden Farbstoffen und Lichtquellen [23, 63, 116]. Futrell und Riddle beschrieben ebenfalls eine Schädigung des Endothels mit Offenlegung des Subendothels und Ausbildung eines Thrombus nach Beleuchtung eines Gefäßabschnitts in einer Untersuchung an der Arteria carotis bei der Ratte [41]. Ein möglicher Mechanismus der Photothrombose liegt in der Sensibilisierung des Endothels auf Lichteinwirkung durch den applizierten Farbstoff. Hieraus resultiert eine Schädigung des Endothels, wobei Sauerstoffradikale möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung des Endothelschadens spielen [148]. Die genaueren Mechanismen sind bisher jedoch nicht bekannt.

In den vorliegenden Versuchen führte die Injektion des photosensibilisierenden Farbstoffs Photosan zu einer progredienten Initiierung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen mit anschließender Thrombusbildung. Die Beurteilung einzelner Thrombozyten und ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel war sehr einfach möglich. Schon zwei Minuten nach Beginn der Beleuchtung und Injektion des Farbstoffs kam es zu einem signifikanten Anstieg der rollenden Thrombozyten in Arteriolen und Venolen. Nach 8 Minuten wurden in den Venolen signifikant erhöhte Zahlen adhärenter Thrombozyten festgestellt. Der Anstieg der adhärenter Thrombozyten in den Arteriolen war nicht signifikant. Dies lässt sich möglicherweise durch die höheren Flussgeschwindigkeiten des Blutes in den Arteriolen erklären. Diese Ergebnisse zeigen, dass die vorgestellte Methode der Thrombozytenisolierung und -färbung eine quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelinteraktion ermöglicht. Die Thrombozyten behalten durch das Verfahren ihre Aktivierbarkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

4.4.2 Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation

4.4.2.1 Das Kallikrein-Kinin System im zentralen Nervensystem

In Säugetieren sind zwei verschiedene Aktivierungswege des Kallikrein-Kinin Systems bekannt. Einer dieser Aktivierungswege läuft im Plasma, der andere im Gewebe ab. Bei der plasmatischen Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems wird der inaktive Hageman-Faktor durch Bindung an negative Oberflächen aktiviert. Die negativen Oberflächen entstehen zum Beispiel durch Schädigung des Gefäßendothels mit daraus resultierender Freilegung der Basalmembran. Der aktivierte Hageman-Faktor spaltet Plasmakallikrein von Präkallikrein ab, dieses setzt Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen frei. Im Gewebe wird aus dem Gewebeprekallikrein durch proteolytische Spaltung Gewebekallikrein freigesetzt. Dieses setzt wiederum das Decapeptid Lys-BK aus niedermolekularem Kininogen frei.

Um eine Beteiligung von Bradykinin bei verschiedenen zerebralen Pathologien untersuchen zu können, ist es wichtig zu wissen, ob dieses System mit all seinen Bestandteilen im Zentralnervensystem vorhanden ist.

So konnte die Existenz von Gewebekallikrein und Plasmakallikrein im zentralen Nervensystem verschiedener Spezies nachgewiesen werden [10, 12, 76, 100, 155]. Die Existenz der aktiven Kallikreinformen lässt auf die Existenz der Präkallikreine und der Proteasen, welche zu deren Aktivierung führen, schließen. Auch das Vorkommen der Kinine im Zentralnervensystem konnte von vielen Arbeitsgruppen gezeigt werden [16, 68, 69, 132, 159, 193], woraus sich auch die Existenz der Kininogene ableiten lässt.

Die Wirkung der Kinine erfolgt über die Aktivierung der Kinin Rezeptoren. Dabei unterscheidet man zwischen dem Kinin B₁ und dem Kinin B₂ Rezeptor. Der Kinin B₂ Rezeptor ist konstitutiv exprimiert und wurde mehrfach in Gehirnen von Menschen [20, 136, 138] und unterschiedlichen Tieren nachge-

wiesen [13, 39, 40, 121, 122, 158]. Am Kinin B₂ Rezeptor wirken hauptsächlich die Peptide Bradykinin und Kallidin. Im Gegensatz zum Kinin B₂ Rezeptor wird der Kinin B₁Rezeptor kaum konstitutiv sondern erst nach Stimulation exprimiert [100, 102, 136, 141] und vorwiegend durch die Peptide des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin stimuliert. Diese Kinine werden durch Abspaltung des C-terminalen Arginin durch Kininase I gebildet und stellen Degradationsprodukte von Bradykinin und Kallidin dar (siehe Abbildung 31). Auch die einzelnen Enzyme, die zu einer Degradation der Kinine führen, sind im ZNS nachgewiesen worden [67, 130].

Das Kallikrein-Kinin System hat im zentralen Nervensystem sowohl eine physiologische Bedeutung als auch eine Funktion bei pathophysiologischen Prozessen. Physiologisch scheint es eine Rolle bei der zentralen Blutdruckregulation zu spielen. Dies geschieht möglicherweise durch Modulation sympathischer Zentren [94, 135]. Außerdem ist das Kallikrein-Kinin System an der Thermoregulation [2] und der Ausschüttung von GnRH [158] beteiligt.

Wie bereits eingangs erläutert spielt das Kallikrein-Kinin System eine bedeutende Rolle bei der Entzündungsreaktion. Als Entzündungsmediatoren führen die Kinine im Gewebe zu den Entzündungszeichen Rubor, Calor, Tumor und Dolor [18]. In diesem Zusammenhang beeinflusst das Kallikrein-Kinin System zahlreiche Krankheitsbilder des Zentralnervensystems, darunter die zerebrale Ischämie, das Schädel-Hirn Trauma, die Meningitis oder auch die Epilepsie.

So konnten erhöhte Konzentrationen an Kininogen und Kinin in der interstitiellen Flüssigkeit des Spinalmarks nach traumatischer Kälteläsion und im Gehirn nach Fluid percussion injury nachgewiesen werden [31, 193]. Auch eine dreistündige Okklusion der beiden Aa. carotides der Ratte führte zu einer stark erhöhten Konzentration von Bradykinin in Plasma und Gewebe [66]. Unterberg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Hemmung des Enzyms Kallikrein durch Aprotinin oder Soybean Trypsin Inhibitor bei der fokalen Kälteläsion am Kaninchen zu einer Verminderung des Hirnödems führt [179]. Dies konnte auch für die zerebrale Ischämie nachgewiesen werden [66].

Eine Reihe von Untersuchungen weisen daraufhin, dass für diese Vorgänge der Kinin B₂ Rezeptor verantwortlich ist. So führte die Hemmung des Kinin B₂ Rezeptors mit den selektiven Antagonisten CP0597 oder LF 16-0687Ms bei der transienten fokalen Ischämie bei der Ratte zu einer Verminderung des Infarktolumens und des Hirnödems [145, 195]. Diese Protektion durch Blockade des Kinin B₂ Rezeptors konnte auch beim Schädel-Hirn Trauma [47, 133] und der Pneumokokkenmeningitis [96] gezeigt werden. Welche Mechanismen für die schädigende Wirkung des Kallikrein-Kinin Systems verantwortlich sind, ist weitgehend unklar. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems zu Veränderungen der Mikrozirkulation führt, welche einen primären Schaden verstärken können.

4.4.2.2 Gefäßdurchmesser

Seit seiner Entdeckung wurde das Kallikrein-Kinin System mit der Regulation des Herz-Kreislauf Systems in Verbindung gebracht. Nach intravenöser Injektion von Bradykinin bei Säugetieren kommt es zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks, vermittelt durch eine Dilatation von Arterien und eine daraus resultierende Reduktion des systemischen Gefäßwiderstands [141]. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass Bradykinin nicht nur zu einer Vasodilatation, sondern auch zu einer Vaso-
konstriktion führen kann. Die Wirkung des Kallikrein-Kinin Systems auf die Vasomotorik ist dabei abhängig von der untersuchten Spezies, der Gefäßregion und dem Versuchsprotokoll.

Regoli und Mitarbeiter untersuchten als eine der ersten Arbeitsgruppen 1977 die Wirkung verschiedener Kinine auf die Aorta und die V. jugularis des Kaninchens [142]. Dabei konnten sie eine unterschiedliche Wirkung der einzelnen Kinine auf die Gefäßsegmente feststellen, LysdesArg⁹Bradykinin führte zu einer Kontraktion der Aorta, [TyrMe⁸]Bradykinin und Bradykinin führten zu einer Kontraktion der V. jugularis. Die Aktivität der Substanzen war dabei für beide Gefäße gegensätzlich. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Entdeckung des Kinin B₁ und des Kinin B₂ Rezeptors und der typischen Agonisten an diesen Rezeptoren. Darauf folgende Untersuchungen führten zur Aufdeckung der zugrunde liegenden Mechanismen der Kinin-vermittelten Gefäßkontraktion (siehe Abbildung 42) [144].

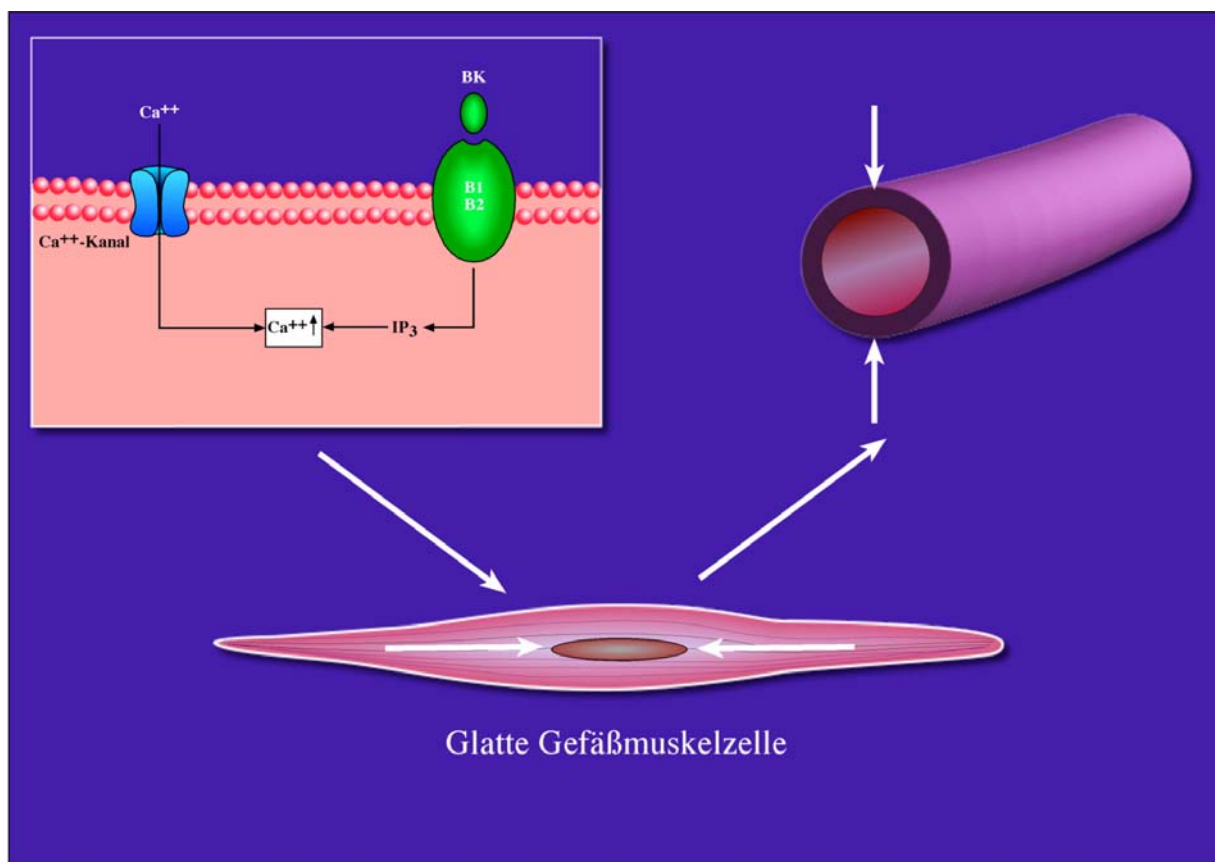


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Mechanismen der Gefäßkontraktion durch Aktivierung von Kinin B₁ oder B₂ Rezeptoren. Nach Bindung eines Kinins an den jeweiligen Kinin Rezeptor kommt es über Phospholipase C zu einer Freisetzung von Inositol-3-Phosphat (IP₃). Dieses führt zur Erhö-

hung der intrazellulären Kalziumkonzentration und ermöglicht so die Kontraktion der Zelle. Dieser Mechanismus gilt in der Aorta des Kaninchens, der V. jugularis des Kaninchens und des Hundes und der V. umbilicalis des Menschen (Abbildung modifiziert nach Regoli et al. 1996).

Zur Untersuchung der vasodilatativen Eigenschaften der Kinine wurde in zahlreichen Studien die A. carotis des Hundes verwendet. Dieses Gefäß hat die Eigenschaft nach Kontraktion, z.B. durch Noradrenalin, diese Kontraktion gleichbleibend aufrecht zu erhalten, ferner kann die Kontraktion durch Vasodilatoren relaxiert werden. Couture und Mitarbeiter untersuchten in diesem Modell die Wirkung der Kinine und von Substanz P und stellten bei diesen Substanzen eine konzentrationsabhängige Dilatation des untersuchten Gefäßes fest [17]. Auch hier wurden in darauf folgenden Untersuchungen verschiedene Mechanismen aufgedeckt (siehe Abbildung 43).

Im zentralen Nervensystem wurde gezeigt, dass Bradykinin zur Relaxation der A. cerebri media von Katzen [189], der A. basilaris von Kaninchen [189] und der humanen Aa. basillares [188] durch die Aktivierung des Kinin B₂ Rezeptors führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine mehrmalige intermittierende Gabe von Bradykinin über zehn Stunden zu einer Kontraktion der A. basilaris von Kaninchen führt und diese Antwort durch Hemmstoffe der Proteinbiosynthese reduziert werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass für diese Reaktion eine de novo Synthese von Kinin B₁ Rezeptoren nötig ist [189].

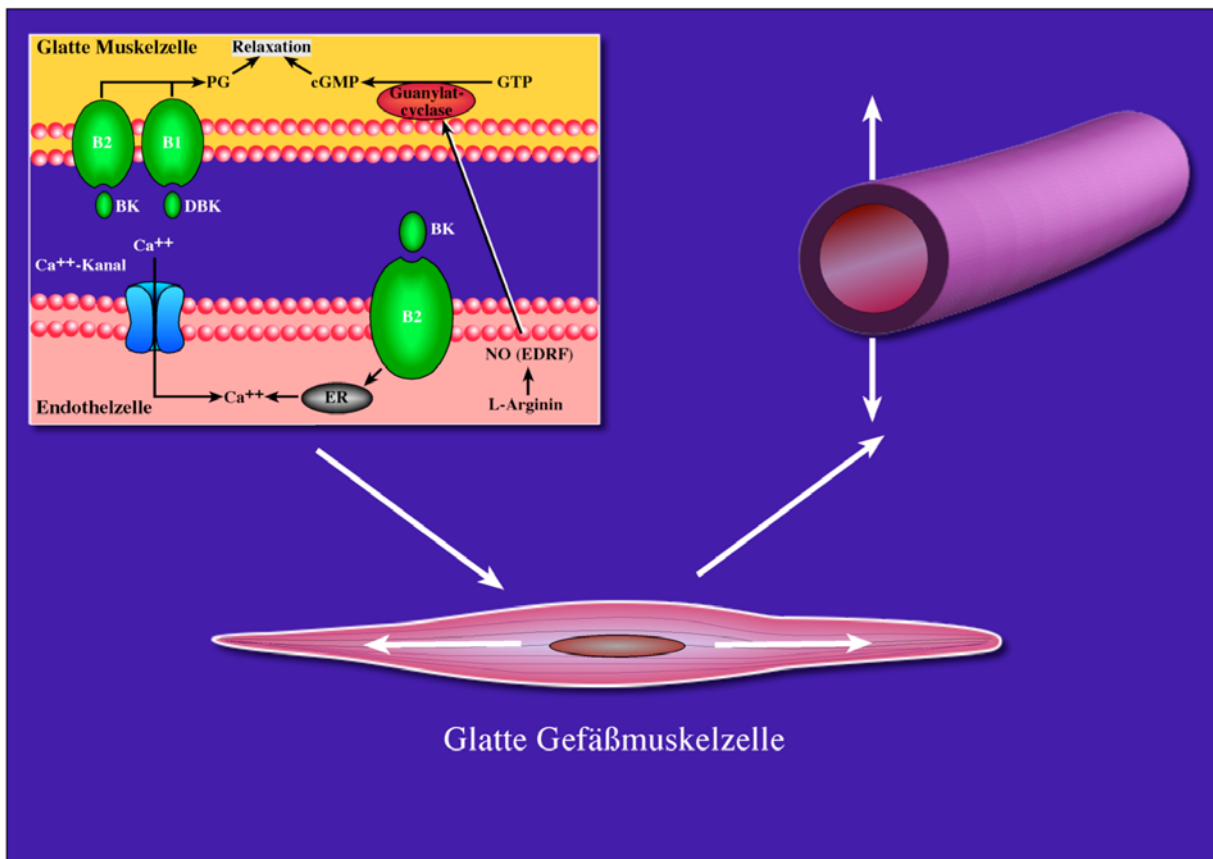


Abbildung 43: Schematische Darstellung zweier Mechanismen die nach Aktivierung von Kinin Rezeptoren zu einer Vasodilatation führen. In der A. carotis des Hundes führt eine Aktivierung des endothelialen Kinin B₂ Rezeptors zu einer NO-Produktion. NO diffundiert zu den glatten Muskelzellen und führt durch Aktivierung der Guanylatzyklase zu einer Relaxation. In der A. renalis des Hundes führt

zusätzlich zum oben genannten Mechanismus eine Aktivierung von Kinin B₁ oder B₂ Rezeptoren zu einer erhöhten Synthese von Prostaglandin-Derivaten (PG). BK: Bradykinin, DBK: desArg-Bradykinin, ER: endoplasmatisches Retikulum, GTP: Guanosyltriphosphat, cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat. (Abbildung modifiziert nach Regoli et al. 1996)

In unterschiedlichen Studien führte nur eine perivasale Applikation oder Superfusion des Kortex mit Bradykinin zu einer Gefäßreaktion. Die intravasale Applikation von Bradykinin führte zu keiner messbaren Veränderung der Gefäßdurchmesser [180, 189]. Die Autoren erklärten die Ergebnisse durch die Theorie, dass Kinin B₂ Rezeptoren nicht auf dem Endothel, sondern auf der glatten Gefäßmuskulatur vorhanden sind. Eine Bindung von Bradykinin an den Kinin B₂ Rezeptor der glatten Gefäßmuskulatur führt dabei zu einer Gefäßdilataion.

In den eigenen Versuchen zur Dosisfindung kam es in der Kontrollgruppe während des gesamten Untersuchungszeitraums zu keiner Veränderung der Gefäßdurchmesser in den Arteriolen. Dies zeigt, dass die Untersuchungsbedingungen die Vasomotorik der pialen Arteriolen nicht beeinflussen. In den beiden Gruppen mit der niedrigeren Bradykinin-Infusion blieben die Durchmesser der Arteriolen ebenfalls während des Untersuchungszeitraums konstant. Lediglich die Infusion der höheren Bradykinin-Konzentrationen führt zu einer geringen Verminderung der arteriolen Gefäßdurchmesser während der Infusion mit einer darauf folgenden Dilatation in den Normbereich. Dieser Ergebnisse erklären sich durch eine reaktive Kontraktion der Gefäße aufgrund des zeitgleich auftretenden Abfalls des mittleren arteriellen Blutdrucks in diesen Versuchsgruppen. Eine direkte Wirkung von Bradykinin auf die Gefäßmotorik ist dabei eher unwahrscheinlich, da die Veränderungen nur in den Versuchen auftraten, in denen es auch zu einem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks kam. Die hier erwähnten Durchmesseränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Durchmesser der Venolen blieben in allen Versuchsgruppen konstant.

In den Versuchen mit Gabe der Kinin Rezeptor-Antagonisten führte die Gabe des Kinin B₁ Rezeptor-Antagonisten wie bei der Gruppe ohne Antagonisten zu einer Abnahme der arteriolen Gefäßdurchmesser während der Bradykinin-Infusion mit darauf folgender Relaxation. Bei der Gruppe, die den Kinin B₂ Rezeptor-Antagonisten erhielt, trat diese Abnahme der arteriolen Gefäßdurchmesser nicht auf. Diese Ergebnisse lassen sich ebenfalls durch eine geringe Beeinflussung des mittleren arteriellen Blutdrucks bei den Versuchstieren, die den Kinin B₂ Rezeptor-Antagonisten erhielten, erklären. Die Tatsache, dass der mittlere arterielle Blutdruck während der Bradykinin-Infusion auch bei Gabe des Kinin B₂ Rezeptor-Antagonists diskret abfiel, lässt sich durch eine systemische Vasodilatation durch den Kinin B₁ Rezeptor erklären [153].

Die Unterschiede der arteriolen Gefäßdurchmesser waren statistisch nicht signifikant. Auch konnte bei diesen Versuchen keine Veränderung der venolären Gefäßdurchmesser beobachtet werden.

Die Ergebnisse unterstützen die Untersuchungen von Unterberg und Mitarbeitern, dass eine intravasale Applikation von Bradykinin die Vasomotorik nicht beeinflusst. Lehmborg und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung verschiedener Kinin Rezeptor-Antagonisten auf Gefäßdurchmesser vor, während und nach globaler zerebraler Ischämie bei der Wüstenrennmaus. Hier führte die Gabe eines Kinin B₂

Rezeptor-Antagonisten in der Reperfusionphase zu einer signifikanten Verringerung der arteriölen Durchmesser [90]. Die Autoren postulierten als Mechanismus eine Freisetzung von Bradykinin in der Reperfusionphase mit Wirkung an endothelialen Kinin B₂ Rezeptoren und daraus resultierender Vasodilatation. Da diese Ergebnisse im Rahmen eines pathologischen Ereignisses erhoben wurden, können sie nicht mit den vorgestellten Ergebnissen verglichen werden.

4.4.2.3 Gefäßpermeabilität

In einer Studie an Katzen untersuchten Unterberg und Mitarbeiter mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die Wirkung von Bradykinin auf die Gefäßpermeabilität in der zerebralen Mikrozirkulation [180]. Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl eine intra- als auch eine extravasale Applikation von Bradykinin zu einer, vermutlich Kinin B₂-Rezeptor vermittelten, Extravasation von Natrium-Fluoreszein, nicht aber von größeren Molekülen wie FITC-Dextran oder FITC-Albumin, führt. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass Bradykinin zu einer selektiven Öffnung der Blut-Hirn Schranke führt.

In der peripheren Mikrozirkulation konnte eine Reduktion der Bradykinin-induzierten Permeabilitäts-erhöhung durch den Betarezeptorenblocker Isoproterenol erzielt werden [171, 172]. Es wurde vermutet, dass Isoproterenol eine Bradykinin-vermittelte Permeabilitätserhöhung durch Relaxation von Endothelzellen, welche durch Bradykinin kontrahiert werden, inhibiert. Für die zerebrale Mikrozirkulation wurde als möglicher Mechanismus eine Öffnung der „tight junctions“ der Blut-Hirn Schranke vermittelt durch eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration und eine Kontraktion der Endothelzellen postuliert [184].

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte weder eine Extravasation des Farbstoffes Texas Red-Dextran während des Versuchsablaufs, noch des Farbstoffs Natrium-Fluoreszein am Ende des Untersuchungszeitraums beobachtet werden. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der infundierten Bradykinin-Konzentration. Diese Ergebnisse stehen in einem Widerspruch zu den Ergebnissen von Unterberg und Mitarbeitern nach intravasaler Applikation von Bradykinin [180]. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass Unterberg und Mitarbeiter die Extravasation des Farbstoffs 1, 15 und 30 Minuten nach Beginn der insgesamt 30 minütigen Bradykinin-Applikation bestimmten. In den vorgestellten Untersuchungen erfolgte die Gabe des Farbstoffs Natrium-Fluoreszein mit darauffolgender Beurteilung einer möglichen Extravasation 3 Stunden nach Ende der Bradykinin-Infusion. Eine Permeabilitätsstörung könnte also aufgetreten sein, sich aber zum untersuchten Zeitpunkt wieder zurück gebildet haben. Genauere Daten über eine zeitliche Abhängigkeit einer Bradykinin-vermittelten Öffnung der Blut-Hirn Schranke sind zum aktuellen Zeitpunkt leider nicht verfügbar.

Des Weiteren war die Extravasation von Natrium-Fluoreszein bei den Versuchen von Unterberg und Mitarbeitern abhängig von der Infusionsgeschwindigkeit. So führte zwar die Infusion einer 10⁻³ M Bradykinin-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min zu einer Extravasation von Natrium-Fluoreszein, nicht aber die Infusion derselben Konzentration mit 0,1 - 0,5 ml/min. In den eigenen

Versuchen erfolgte die Infusion der unterschiedlichen Bradykinin-Konzentrationen mit einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/h, so dass von wesentlich geringeren lokalen Bradykinin-Konzentration auszugehen ist.

4.4.2.4 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Neben der Wirkung auf die Vasomotorik und die Permeabilität von Gefäßen scheint das Kallikrein-Kinin System auch eine Rolle bei der Leukozyten-Aktivierung zu spielen. Dabei ist es von Bedeutung, dass einzelne Komponenten des Kallikrein-Kinin Systems, darunter Hagemann Faktor, Präkallikrein, high molecular weight kininogen usw., an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten gebunden vorliegen und so eine Freisetzung von Bradykinin ermöglichen (siehe Abbildung 44) [36, 54]. Das entstandene Bradykinin kann einerseits an Kinin-Rezeptoren des Endothels binden, andererseits auch an Kinin-Rezeptoren der Granulozyten selbst.

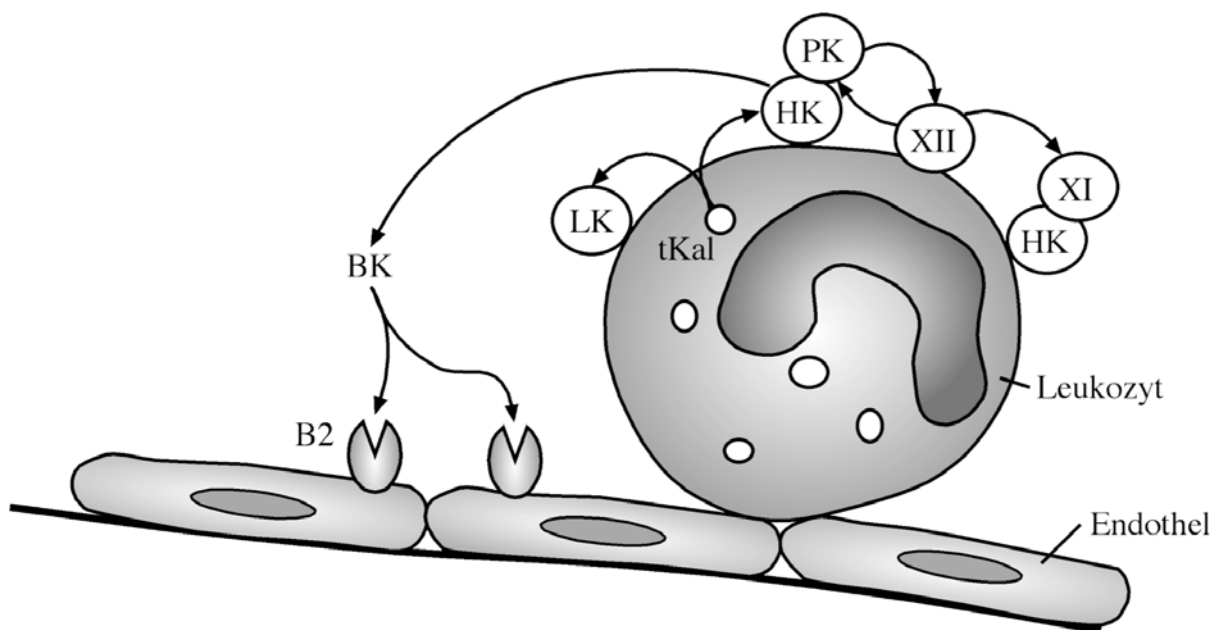


Abbildung 44: Das Kallikrein-Kinin System und Leukozyten. Alle für die Freisetzung von Bradykinin (BK) wichtigen Komponenten des Kallikrein-Kinin Systems sind an neutrophile Granulozyten gebunden. Aktivierter Hagemann Faktor (XII) führt zur Freisetzung von Kallikrein aus Präkallikrein (PK). Kallikrein führt wiederum zur Freisetzung von Bradykinin aus high molecular weight kininogen (HK). Gewebekallikrein (tKal) kann Bradykinin aus low molecular weight kininogen (LK) oder high molecular weight kininogen freisetzen. Auch Faktor XI kann Kinine aus high molecular weight kininogen freisetzen. Das freigesetzte Bradykinin kann an B2-Rezeptoren des Endothels oder direkt an Leukozyten binden. (Abbildung modifiziert nach Henderson und Mitarbeitern [54])

Bezüglich der Wirkung des Kallikrein-Kinin Systems auf die einzelnen Schritte der Leukozyten-Aktivierung konnte gezeigt werden, dass interstitiell appliziertes Bradykinin im Gehirn eine Chemotaxis von Granulozyten bewirkt [190]. Lehmborg und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von Kinin B₁, B₂ oder B₁/B₂ Rezeptor Antagonisten auf Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globa-

len zerebralen Ischämie des Gerbils [90]. In dieser Untersuchung fand sich eine Reduktion der Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten durch alle Kinin Rezeptor Antagonisten.

Als möglicher Mechanismus für die Kinin vermittelte Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßendothel kommt eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen oder Leukozyten in Frage. So beschrieben Tayeh und Scicli *in vitro* eine erhöhte Expression von P-Selektin auf Endothelzellen (HUVEC) nach Zugabe von Bradykinin zum Kulturmedium [173].

Nach ihrer Aktivierung und der Interaktion mit den Endothelzellen können Leukozyten auf unterschiedliche Weise zu einer Progression einer Gewebsschädigung bei Entzündungsvorgängen führen. Zum Beispiel durch Steckenbleiben in Gefäßen, Freisetzen vasokonstriktiver Substanzen und Verursachung von Thrombosen können sie die Durchblutung herabsetzen oder direkt nach Transmigration in das Parenchym durch Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Mediatoren oder reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Schädigung der Blut-Hirn Schranke oder des Hirnparenchyms führen [77].

Neben der Wirkung auf die Leukozyten-Endothelinteraktion konnte auch gezeigt werden, dass Bradykinin zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen aus Leukozyten führt. So konnte bei Makrophagen durch Bradykinin eine Freisetzung von Interleukin-1 und TNF hervorgerufen werden [175].

Bei den vorgestellten Versuchen führte die Infusion von Bradykinin in den Dosierungen von 10^{-2} und 10^{-3} M zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl am Endothel rollender Leukozyten 90 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es kam ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten mit einem Maximum 90 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt. Die Unterschiede waren dosisabhängig, wobei die effektivste Dosis 10^{-2} M Bradykinin war. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen bezüglich der Adhärenz von Leukozyten.

In den Versuchen mit Hinzugabe der Kinin Rezeptor Antagonisten konnte durch Hinzugabe des Kinin B_2 Rezeptor Antagonisten HOE 140 eine signifikante Verringerung der Anzahl rollender Leukozyten 150 Minuten nach Beginn der Infusion im Vergleich zur Gruppe ohne Antagonisten erzielt werden. Die Anzahl der adhärenter Leukozyten war in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert, unterschied sich jedoch nicht signifikant. Die Gabe des Kinin B_1 Rezeptor Antagonisten B6292 führte zu keinem Unterschied bezüglich der Anzahl rollender Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Anzahl der adhärenter Leukozyten war 150 und 210 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Infusion höher als in der Kontrollgruppe, unterschied sich jedoch nicht signifikant.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Bradykinin zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Leukozyten-Endothelinteraktionen führt und dieser Effekt durch den Kinin B_2 Rezeptor vermittelt wird.

Diese Ergebnisse bestätigen eine Untersuchung von Shigematsu und Mitarbeitern [161]. Die Autoren untersuchten dabei die Wirkung von Bradykinin auf die Mikrozirkulation im Mesenterium der Ratte. Hierbei führte die Superfusion von Bradykinin in verschiedenen Konzentrationen zu einer erhöhten

Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten. Dieser Effekt war ebenfalls Dosisabhängig und konnte durch den Kinin B₂ Rezeptor Antagonisten HOE 140 gehemmt werden.

Andererseits stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu einer Untersuchung derselben Arbeitsgruppe nach Ischämie und Reperfusion des Mesenteriums der Ratte [160]. Hier führte eine Superfusion des Mesenteriums mit Bradykinin in sehr niedriger Dosierung (10 nM Bradykinin) nach Ischämie und Reperfusion zu einer Reduktion der Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten. Der Effekt ließ sich dabei durch den Kinin B₂ Rezeptor Antagonisten HOE 140 oder den NO-Synthase Hemmer L-NAME reduzieren. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen zeigten Lehmborg und Mitarbeiter, wie bereits weiter oben erwähnt, eine Reduktion der Leukozyten-Endothelinteraktionen nach globaler Ischämie in der zerebralen Mikrozirkulation durch Gabe von Kinin B₂, B₁ und B₁/B₂ Rezeptor Antagonisten [90]. Da in den Versuchen von Shigematsu und Mitarbeitern die Wirkung des Kinin B₂ Rezeptor Antagonisten auf die Leukozyten-Endothelinteraktionen nach Ischämie und Reperfusion nicht ohne Zugabe von Bradykinin untersucht wurde, sind diese Ergebnisse nicht zu vergleichen. Die Zugabe eines Entzündungsmediators wie Bradykinin zu einem pathologischen Ablauf wie der Ischämie/Reperfusion erhöht die Komplexität der einzelnen Mechanismen, so dass eine Beurteilung der einzelnen Abläufe schwierig erscheint. Die Wirkung des endogenen Kallikrein-Kinin Systems wurde in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt. Shigematsu und Mitarbeiter erklärten dabei die Unterschiede ihrer eigenen Untersuchungen durch die Hypothese, dass Bradykinin in niedriger Dosierung zu einer Kinin B₂ Rezeptor vermittelten Produktion NO führt, welches für seine hemmende Wirkung auf die Leukozyten-Aktivierung bekannt ist [82, 84]. In höherer Dosierung führt Bradykinin zur Freisetzung weiterer Mediatoren, wie zum Beispiel PAF (platelet activating factor), welche dann Leukozyten-Endothelinteraktionen verstärken.

Bei den vorgestellten Versuchen konnte eine hemmende Wirkung von Bradykinin in niedrigen Dosierungen auf die Leukozyten-Endothelinteraktion nicht festgestellt werden, da unter Kontrollbedingungen nur sehr geringe Interaktionen feststellbar waren.

4.4.2.5 Thrombozyten-Endothelinteraktionen

Ähnlich wie bei der Leukozyten-Endothelinteraktion führte die Infusion von Bradykinin zu einer dosisabhängigen Initiierung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen. In den beiden Gruppen mit niedrig dosierter Bradykinin-Infusion kam es zu einer erhöhten Anzahl rollender Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In den beiden Gruppen mit höher dosierter Bradykinin-Infusion war die Anzahl der rollenden Thrombozyten 90 und 210 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Infusion signifikant erhöht. Als möglicher Mechanismus kommt ein Rollen der Thrombozyten auf endotheliale P-Selectin in Frage. Wie bereits weiter oben erwähnt konnte gezeigt werden, dass Bradykinin zu einer Hochregulation von P-Selectin auf Endothelzellen führt. Ferner konnten Frenette und Mitarbeiter in einer intravitalmikroskopischen Untersuchung an

Mäusen zeigen, dass Thrombozyten durch einen P-Selectin abhängigen Mechanismus auf Endothelzellen rollen können [38]. Dieser Vorgang wird vermittelt durch endotheliales P-Selectin und ist unabhängig von einer Thrombozytenaktivierung. Auch andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen [70, 103]. Der Rezeptor auf den Thrombozyten, welcher P-Selectin bindet, ist bisher unklar. Diskutiert wurde unter anderem der Glycoprotein-Rezeptor Ib α [70].

Wie bereits bei der Leukozyten-Endothelinteraktion konnte die Anzahl rollender Thrombozyten durch den Kinin B₂ Rezeptor HOE 140 verringert werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine als Ursache mögliche P-Selectin-Hochregulation Kinin B₂ Rezeptor abhängig ist. Daten aus anderen Studien sind bezüglich der Initiierung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen durch Bradykinin bisher nicht verfügbar.

Wie weiter oben beschrieben führte die Infusion von Bradykinin zu einer Initiierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen mit erhöhten Zahlen am Endothel rollender und adhärenter Leukozyten. Im Gegensatz dazu führte die Bradykinin-Infusion nur zur Erhöhung der am Endothel rollenden Thrombozyten, nicht aber zur Adhärenz von Thrombozyten. Eine möglicher Erklärung für diese Ergebnisse bieten Untersuchungen von Massberg und Mitarbeitern [104]. Sie zeigten in einer intravitalmikroskopischen Studie am Mesenterium der Maus nach Ischämie und Reperfusion eine vermehrte Adhärenz von Thrombozyten am venolären Gefäßendothel. Diese Interaktionen waren abhängig von einer Expression des endothelialen Rezeptors ICAM-1 und einer Fibrinogen-Bindung an diesen Rezeptor. Ferner postulierten die Autoren, dass der, nur nach Thrombozytenaktivierung bindungsfähige, Thrombozytenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin für die Adhärenz verantwortlich sei.

Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass Bradykinin und seine Metabolite eine Hemmung der Thrombin-abhängigen Thrombozytenaktivierung verursachen und somit als Antithrombine gelten [53, 134]. Somit wäre es denkbar, dass Bradykinin durch Hochregulation endothelialer Rezeptoren wie z.B. P-Selektin ein Rollen von Thrombozyten am Gefäßendothel vermittelt, aufgrund der fehlenden Aktivierung der Thrombozyten jedoch eine feste Adhärenz nicht folgen kann.

Zusammenfassend weisen die vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass Bradykinin zum Rollen von Thrombozyten am Gefäßendothel führen kann, eine feste Adhärenz der Thrombozyten am Endothel jedoch durch die aktivierungshemmende Eigenschaft von Bradykinin und seinen Metaboliten verhindert werden kann.

4.4.2.6 Funktionelle Kapillardichte

Die Infusion von Bradykinin in den verschiedenen Dosierungen führte lediglich in der Gruppe mit 10⁻²M Bradykinin zu einem Abfall der funktionellen Kapillardichte 90 und 150 Minuten nach Beginn der Bradykinin-Infusion mit darauf folgendem Anstieg der Kapillardichte. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bestand dabei nicht.

Allerdings führte die Gabe des Kinin B₁ Rezeptor-Antagonisten zu einem zunehmenden Abfall der funktionellen Kapillardichte nach Beginn der Bradykinin-Infusion. In der Versuchsgruppe mit dem Kinin B₂ Rezeptor-Antagonisten blieb die funktionelle Kapillardichte während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass Bradykinin durch einen Kinin B₂ Rezeptor-abhängigen Mechanismus zu einer Reduktion der funktionellen Kapillardichte führen und diesem Effekt eine Aktivierung des Kinin B₁ Rezeptors entgegen wirkt. Die genaueren Mechanismen dieser Beobachtung sind dabei unklar. Während der Untersuchung der Kapillardichte konnten in den einzelnen Versuchen keine Leukozyten, Thrombozyten oder Aggregate dieser Zellen in den Kapillargefäßen beobachtet werden. Möglicherweise steht der Abfall der funktionellen Kapillardichte auch mit einem Abfall des systemischen Blutdrucks, welcher ebenfalls in diesen Versuchsgruppen beobachtet wurde, in Zusammenhang. Als weitere Ursachen kommen wie bereits weiter oben erwähnt, eine Verminderung der Kapillardurchmesser durch Schwellung von Endothelzellen, eine Bildung von Protrusionen der Endothelzellmembranen oder eine Schwellung von Gliazellen in Frage.

4.4.2.7 Mikrovaskuläre Durchblutung

Sowohl die Daten der arterio-venösen Transitzeit als auch der Laser-Doppler Fluxmetrie ergaben einen Abfall der mikrovaskulären Durchblutung während der Bradykinin-Infusion mit Erholung der Werte in den Bereich des Ausgangswertes nach Ende der Infusion in den Versuchsgruppen mit der Infusion von $2,5 \cdot 10^{-2}$ und 10^{-2} M Bradykinin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum gleichen Zeitpunkt kam es auch zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks. Die mikrovaskuläre Durchblutung blieb in den Versuchsgruppen mit niedriger dosierter Bradykinin-Infusion während der Infusion konstant, es kam jedoch bei diesen Versuchen zu einem Anstieg der Durchblutungswerte in der Laser-Doppler Fluxmetrie bis zum Ende des Versuchs. Diese Ergebnisse bestätigen eine Untersuchung von Muraishi und Mitarbeitern [120]. Nach Infusion verschiedener Bradykinin-Konzentrationen in die A. carotis des Kaninchens konnte in diesen Experimenten ein initialer Abfall der Durchblutung nach Beginn der Infusion mit darauf folgender Erholung der Werte festgestellt werden.

Im Gegensatz zum Kinin B₁ Rezeptor Antagonisten konnte bei Gabe des Kinin B₂ Rezeptor Antagonisten ein Abfall der mikrovaskulären Durchblutung während der Bradykinin-Infusion nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine lokale Bradykinin-Applikation durch einen Kinin B₂ Rezeptor abhängigen Mechanismus zu einem kurzzeitigen Abfall der Durchblutung führt, welcher reversibel und möglicherweise durch einen systemischen Blutdruckabfall, verursacht durch eine Kinin B₁ Rezeptor vermittelte systemische Vasodilatation, mit bedingt ist. Der Abfall der Durchblutung gegen Ende des Untersuchungszeitraums durch Gabe des Kinin B₁ Rezeptor Antagonisten könnte möglicherweise eine Folge der weiter oben beschriebenen Reduktion der Kapillardichte sein.

4.4.2.8 Histologie

Die Infusion Bradykinin in die A. carotis führte in den vorgestellten Experimenten zu einer dosisabhängigen Auswanderung von Granulozyten in das Hirnparenchym. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Auch dieser Parameter zeigt eine Hemmung der Einwanderung der Granulozyten durch den Kinin B₂ Rezeptor Antagonisten, welche ebenfalls nicht signifikant war. Die Gabe des Kinin B₁ Rezeptor Antagonisten führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl ausgewanderter Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass eine Aktivierung von Leukozyten in der zerebralen Mikrozirkulation durch den Kinin B₂ Rezeptor vermittelt wird. Der Kinin B₁ Rezeptor scheint einen protektiven Effekt zu haben, wobei die exakten Mechanismen unklar sind. Dieser Effekt scheint aber im Bereich der Extravasation der Leukozyten zu liegen, da die Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten durch den Kinin B₁ Rezeptor nicht beeinflusst wurde.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation untersucht. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Beurteilung der Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten mit dem Gefäßendothel. Die verschiedenen Schritte der Leukozyten-Aktivierung wurden bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern nachgewiesen und tragen durch eine Verstärkung einer initialen Entzündungsreaktion zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes bei. Zunehmend gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung der Thrombozyten an der sekundären Gewebsschädigung z.B. nach Ischämie und Reperfusion unterschiedlicher Organsysteme.

Die einzelnen Mechanismen, die zur Initiierung von Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen führen sind nur unzureichend verstanden. Untersuchungen an unterschiedlichen Organen und bei unterschiedlichen Krankheitsbildern weisen auf eine Rolle des Kallikrein-Kinin Systems bei der Aktivierung von Leukozyten hin. Die genauen Abläufe und die verantwortlichen Rezeptoren des Kallikrein-Kinin Systems wurden in der zerebralen Mikrozirkulation bisher nicht untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die Wirkung von Bradykinin auf die zerebrale Mikrozirkulation und die dafür verantwortlichen Rezeptoren in einem *in vivo* Modell mit Hilfe der Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie zu untersuchen. Die Beurteilung der Mikrozirkulation sollte dabei *in vivo* erfolgen mit Zuhilfenahme der Histologie zur Beurteilung einer möglichen Extravasation von Leukozyten in das Hirnparenchym.

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde erstmals eine Methode zur Fluoreszenzfärbung von Thrombozyten in der Mongolischen Wüstenrennmaus etabliert. Dies ermöglichte in dem bereits etablierten Tiermodell des geschlossenen Schädelfensters die Untersuchung der einzelnen Schritte der Thrombozyten-Endothelinteraktion *in vivo*. Zur Färbung der Thrombozyten war deren Isolation nötig, wobei die Aufrechterhaltung der Funktion der Thrombozyten *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde. In dem verwendeten Modell war somit die Beurteilung von Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelinteraktionen, arteriellen und venösen Gefäßdurchmessern, der funktionellen Kapillardichte, der mikrovaskulären Durchblutung und der Störung der Blut-Hirnschranke möglich.

Um eine mögliche Rolle des Kallikrein-Kinin Systems bei pathologischen Vorgängen der zerebralen Mikrozirkulation zu untersuchen, erfolgte die intravasale Applikation von Bradykinin in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 30 Minuten in die A. carotis interna.

Während der Bradykinin-Infusion kam es zu einem dosisabhängigen Abfall des Blutdrucks sowie der mikrovaskulären Durchblutung. Diese Werte erholten sich nach Ende der Infusion wieder und erreichten teilweise das Ausgangsniveau. Als möglicher Mechanismus für den Abfall des Blutdrucks und der Durchblutung kommt eine systemische Vasodilatation in Frage. Eine Veränderung der zerebralen Gefäßdurchmesser konnte nicht festgestellt werden. Die Blockade des Kinin B₂ Rezeptors führte zu einer Verringerung des Blutdruckabfalls während der Bradykinin-Infusion sowie zu einem höheren Anstieg des Blutdrucks bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Außerdem führte die Kinin B₂ Rezeptor-Blockade zu einer geringeren Reduktion der mikrovaskulären Durchblutung während der Bradykinin-Infusion. Im Gegensatz dazu führte die Blockade des Kinin B₁ Rezeptors zu einer ausgeprägteren Reduktion der mikrovaskulären Durchblutung während der Infusion sowie am Ende des Beobachtungszeitraums.

Bradykinin induziert einen dosisabhängigen Anstieg der Anzahl rollender und adhärenter Leukozyten. Die Anzahl rollender Leukozyten nahm bis zum Ende des Beobachtungszeitraums stetig zu, die Anzahl adhärenter Leukozyten erreichte den Höchstwert eine Stunde nach Ende der Bradykinin-Infusion. Analog zu den Untersuchungen aus der Intravitalmikroskopie fand sich in der histologischen Untersuchung mit Hilfe der Esterase-Färbung eine erhöhte Anzahl von Leukozyten im Hirnparenchym. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Bradykinin Leukozyten-Endothelinteraktionen initiieren kann und an allen Schritten der Aktivierung bis zur Emigration in das Gewebe beteiligt ist. Diese Vorgänge scheinen durch den Kinin B₂ Rezeptor vermittelt zu werden, da eine Blockade desselben die Leukozyten-Aktivierung verringern konnte. Die Blockade des Kinin B₁ Rezeptors führte zu keiner signifikanten Veränderung der Leukozyten-Endothelinteraktionen.

Analog zur Wirkung auf die Leukozyten-Endothelinteraktion führte Bradykinin zu einer Initiierung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen. Allerdings konnte lediglich eine erhöhte Anzahl rollender Thrombozyten beobachtet werden, adhärenth Thrombozyten wurden nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung bieten Untersuchungen, die zeigen konnten, dass Bradykinin eine Thrombozyten-Aktivierung hemmen kann. Da diese für die Adhärenz der Zellen am Gefäßendothel nötig ist, kann Bradykinin zwar durch Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle ein Rollen der Zellen am Endothel bewirken, jedoch eine feste Adhärenz verhindern. Wie bereits bei den Leukozyten-Endothelinteraktionen führte die Gabe des Kinin B₂ Rezeptorantagonisten zu einer Verringerung der rollenden Thrombozyten.

Die funktionelle Kapillardichte änderte sich durch Infusion von Bradykinin ohne Rezeptorantagonisierung nur vorübergehend. Allerdings führte eine Blockade des Kinin B₁ Rezeptors zu einem stetigen Abfall der funktionellen Kapillardichte bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Die verantwortlichen Mechanismen sind dabei unklar, eine erhöhte Anzahl von adhärenth Leukozyten oder ein Ver-

schluss der untersuchten Gefäßabschnitte durch Thrombozytenaggregate konnte nicht beobachtet werden.

Insgesamt weisen die vorgestellten Versuche auf eine Beteiligung des Kallkrein-Kinin Systems bei der Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten in der zerebralen Mikrozirkulation hin. Dieser Mechanismus scheint durch den Kinin B₂-Rezeptor vermittelt zu werden und wird möglicherweise durch eine Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die Aktivierung des Kinin B₁ Rezeptors könnte eine protektive Wirkung gegen die Mangelperfusion von Kapillaren mit Abnahme der nutritiven Durchblutung haben.

Diese Ergebnisse bieten eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt von Kinin B₂ Rezeptorantagonisten in unterschiedlichen Modellen zerebraler Insulte. Eine protektive Wirkung des Kinin B₁ Rezeptors wurde häufig postuliert, es gibt jedoch bisher wenige Untersuchungen zur Wirkung von Kinin B₁ Rezeptoragonisten bei pathologischen Prozessen des Gehirns. Die vorliegenden Ergebnisse können die Grundlage für weitere Untersuchungen zu Veränderungen der Mikrozirkulation bei verschiedenen Krankheitsbildern des zentralen Nervensystems bilden. Nur eine genaue Kenntnis der komplexen und multifaktoriellen pathophysiologischen Prozesse wird eine effektive Therapie dieser Erkrankungen ermöglichen.

6 Literaturliste

1. Ahluwalia, A. und Perretti, M. Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol* 1996; 156: 269-74
2. Almeida E Silva, T. C. und Pela, I. R. Changes in rectal temperature of the rabbit by intracerebroventricular injection of bradykinin and related kinins. *Agents Actions* 1978; 8: 102-7
3. Ames, A., 3rd, Wright, R. L., Kowada, M., Thurston, J. M. und Majno, G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968; 52: 437-53
4. Armin, S. S., Colohan, A. R. und Zhang, J. H. Traumatic subarachnoid hemorrhage: our current understanding and its evolution over the past half century. *Neurol Res* 2006; 28: 445-52
5. Aukland, K., Bower, B. F. und Berliner, R. W. Measurement of Local Blood Flow with Hydrogen Gas. *Circ Res* 1964; 14: 164-87
6. Baatz, H., Steinbauer, M., Harris, A. G. und Krombach, F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15: 85-91
7. Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. und Worthy, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 1-80
8. Borgos, J. Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow. *Neurol Res* 1996; 18: 251-5
9. Brussel, T., Fitch, W., Brodner, G., Arendt, I. und Van Aken, H. Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in the baboon. *Anesth Analg* 1991; 73: 758-64

10. Cerf, M. E. und Raidoo, D. M. Immunolocalization of plasma kallikrein in human brain. *Metab Brain Dis* 2000; 15: 315-23
11. Cernak, I. Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2005; 2: 410-22
12. Chao, J., Woodley, C., Chao, L. und Margolius, H. S. Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J Biol Chem* 1983; 258: 15173-8
13. Chen, E. Y., Emerich, D. F., Bartus, R. T. und Kordower, J. H. B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 2000; 427: 1-18
14. Chiang, J., Kowada, M., Ames, A., 3rd, Wright, R. L. und Majno, G. Cerebral ischemia. Vascular changes. *Am J Pathol* 1968; 52: 455-76
15. Collier, B. S. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380
16. Correa, F. M., Innis, R. B., Uhl, G. R. und Snyder, S. H. Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 1489-93
17. Couture, R., Gaudreau, P., St-Pierre, S. und Regoli, D. The dog common carotid artery: a sensitive bioassay for studying vasodilator effects of substance P and of kinins. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58: 1234-44
18. Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M. und Cloutier, F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161-76
19. De La Torre, J. C., Fortin, T., Saunders, J. K., Butler, K. und Richard, M. T. The no-reflow phenomenon is a post-mortem artifact. *Acta Neurochir (Wien)* 1992; 115: 37-42

20. De Sousa Buck, H., Ongali, B., Thibault, G., Lindsey, C. J. und Couture, R. Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 249-57
21. Deuel, T. F., Senior, R. M., Chang, D., Griffin, G. L., Henrikson, R. L. und Kaiser, E. T. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 4584-4587
22. Diener, H. C. Stroke prevention: antiplatelet and antithrombotic therapy. *Haemostasis* 2000; 30 Suppl 3: 14-26
23. Dietrich, W. D., Feng, Z. C., Leistra, H., Watson, B. D. und Rosenthal, M. Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 20-8
24. Dirnagl, U., Iadecola, C. und Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-7
25. Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M. und Pulsinelli, W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9: 589-96
26. Dirnagl, U., Niwa, K., Sixt, G. und Villringer, A. Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 1994; 25: 1028-38
27. Dorovini-Zis, K., Bowman, P. D. und Prameya, R. Adhesion and migration of human polymorphonuclear leukocytes across cultured bovine brain microvessel endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 194-205

28. Drayer, B. P., Wolfson, S. K., Reinmuth, O. M., Dujovny, M., Boehnke, M. und Cook, E. E. Xenon enhanced CT for analysis of cerebral integrity, perfusion, and blood flow. *Stroke* 1978; 9: 123-30
29. Duncan, A. M., Kladis, A., Jennings, G. L., Dart, A. M., Esler, M. und Campbell, D. J. Kinins in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R897-904
30. Ebnet, K. und Vestweber, D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 1-23
31. Ellis, E. F., Chao, J. und Heizer, M. L. Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J Neurosurg* 1989; 71: 437-42
32. Ellis, E. F., Wei, E. P., Cockrell, C. S., Choi, S. und Kontos, H. A. The effect of PGF₂ alpha on in vivo cerebral arteriolar diameter in cats and rats. *Prostaglandins* 1983; 26: 917-23
33. Erskine, R. und James, M. F. Isoflurane but not halothane stimulates neutrophil chemotaxis. *Br J Anaesth* 1990; 64: 723-7
34. Farmer, S. G. und Burch, R. M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 511-36
35. Fieschi, C., Bozzao, L., Agnoli, A. und Kety, S. S. [Regional measurements of cerebral blood flow by recording in depth of hydrogen "clearance" curves]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1964; 40: 1505-9
36. Figueroa, C. D., Henderson, L. M., Kaufmann, J., De La Cadena, R. A., Colman, R. W., Muller-Esterl, W. und Bhoola, K. D. Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils. *Blood* 1992; 79: 754-9

37. Finazzi-Agro, A., Menichelli, A., Persiani, M., Biancini, G. und Del Principe, D. Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; 718: 21-25
38. Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O. und Wagner, D. D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7450-4
39. Fujiwara, Y., Mantione, C. R., Vavrek, R. J., Stewart, J. M. und Yamamura, H. I. Characterization of [³H]bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B2 subtypes. *Life Sci* 1989; 44: 1645-53
40. Fujiwara, Y., Mantione, C. R. und Yamamura, H. I. Identification of B2 bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol* 1988; 147: 487-8
41. Futrell, N. und Riddle, J. M. The ultrastructure of photochemically induced thrombi with embolization in a rat model. *Stroke* 1993; 24: 1983-1991
42. Garcia, J. H., Liu, K. F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S. und Del Zoppo, G. J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994; 144: 188-99
43. Ginsberg, M. D. The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997; 18: 1435-45
44. Go, K. G. Chapter I: The blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Cerebral Pathophysiology* 1991; 1: 1-65. Amsterdam - New York - Oxford. ISBN: 0-444-81386-1
45. Go, K. G. Chapter II: The fluid environment of the central nervous system. *Cerebral Pathophysiology* 1991; 1: 66-172. Amsterdam - New York - Oxford. ISBN: 0-444-81386-1

46. Go, K. G. Chapter III: Intracranial pressure. *Cerebral Pathophysiology* 1991; 1: 173-207. Amsterdam - New York - Oxford. ISBN: 0-444-81386-1
47. Gorlach, C., Hortobagyi, T., Hortobagyi, S., Benyo, Z., Relton, J., Whalley, E. T. und Wahl, M. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. *J Neurotrauma* 2001; 18: 833-8
48. Hallenbeck, J. M., Dutka, A. J., Tanishima, T., Kochanek, P. M., Kumaroo, K. K., Thompson, C. B., Obrenovitch, T. P. und Contreras, T. J. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 1986; 17: 246-53
49. Hamblin, A., Taylor, M., Bernhagen, J., Shakoob, Z., Mayall, S., Noble, G. und McCarthy, D. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Methods* 1992; 146: 219-28
50. Hansen, T. D., Warner, D. S., Todd, M. M. und Vust, L. J. Effects of nitrous oxide and volatile anaesthetics on cerebral blood flow. *Br J Anaesth* 1989; 63: 290-295
51. Hansen, T. D., Warner, D. S., Todd, M. M., Vust, L. J. und Trawick, D. C. Distribution of cerebral blood flow during halothane versus isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 1988; 69: 332-337
52. Hartl, R., Schurer, L., Schmid-Schonbein, G. W. und Del Zoppo, G. J. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 1108-19
53. Hasan, A. A., Amenta, S. und Schmaier, A. H. Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation. *Circulation* 1996; 94: 517-28
54. Henderson, L. M., Figueroa, C. D., Muller-Esterl, W. und Bhoola, K. D. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood* 1994; 84: 474-82

55. Heymann, M. A., Payne, B. D., Hoffman, J. I. und Rudolph, A. M. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 1977; 20: 55-79
56. Hoffmann, T. F., Leiderer, R., Waldner, H. und Messmer, K. Bradykinin antagonists HOE-140 and CP-0597 diminish microcirculatory injury after ischaemia-reperfusion of the pancreas in rats. *Br J Surg* 1996; 83: 189-95
57. Holmsen, H. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest* 1994; 24 Suppl 1: 3-8
58. Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F., 3rd und Weiss, S. J. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254: 99-102
59. Ishikawa, M., Sekizuka, E., Oshio, C., Sato, S., Yamaguchi, N., Terao, S., Tsukada, K., Minamitani, H. und Kawase, T. Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows. *J Neurol Sci* 2002; 194: 59-69
60. Ito, U., Go, K. G., Walker, J. T., Jr., Spatz, M. und Klatzo, I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils III. Behaviour of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)* 1976; 34: 1-6
61. Ito, U., Ohno, K., Yamaguchi, T., Tomita, H., Inaba, Y. und Kashima, M. Transient appearance of "no-reflow" phenomenon in Mongolian gerbils. *Stroke* 1980; 11: 517-521
62. Ito, U., Spatz, M., Walker, J. T., Jr. und Klatzo, I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol (Berl)* 1975; 32: 209-23

63. Jander, S., Kraemer, M., Schroeter, M., Witte, O. W. und Stoll, G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 42-51
64. Jay, T. M., Lucignani, G., Crane, A. M., Jehle, J. und Sokoloff, L. Measurement of local cerebral blood flow with [¹⁴C]iodoantipyrine in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8: 121-9
65. Kahn, K. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1972; 22: 510-5
66. Kamiya, T., Katayama, Y., Kashiwagi, F. und Terashi, A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 1993; 24: 571-5
67. Kariya, K., Kawauchi, R. und Okamoto, H. Regional distribution of kininase in rat brain. *J Neurochem* 1981; 36: 2086-8
68. Kariya, K., Yamauchi, A., Hattori, S., Tsuda, Y. und Okada, Y. The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1461-6
69. Kariya, K., Yamauchi, A. und Sasaki, T. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* 1985; 44: 1892-7
70. Katayama, T., Ikeda, Y., Handa, M., Tamatani, T., Sakamoto, S., Ito, M., Ishimura, Y. und Sue-matsu, M. Immunoneutralization of glycoprotein Ib alpha attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ Res* 2000; 86: 1031-7
71. Kempski, O. und Behmanesh, S. Endothelial cell swelling and brain perfusion. *J Trauma* 1997; 42: S38-40

72. Kermer, P., Klocker, N. und Bahr, M. Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 383-95
73. Khandoga, A., Biberthaler, P., Enders, G., Axmann, S., Hutter, J., Messmer, K. und Krombach, F. Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 2002; 74: 681-688
74. Kirkeby, O. J., Rise, I. R., Nordsletten, L., Skjeldal, S., Hall, C. und Risoe, C. Cerebral blood flow measured with intracerebral laser-Dopplerflow probes and radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 1995; 79: 1479-86
75. Kirkpatrick, U. J., Adams, R. A., Lardi, A. und Mccollum, C. N. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br J Haematol* 1998; 101: 364-8
76. Kizuki, K., Suzuki, T., Kudo, M. und Noguchi, T. Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res* 1994; 634: 305-9
77. Kochanek, P. M. und Hallenbeck, J. M. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23: 1367-79
78. Koenig, H. M., Pelligrino, D. A. und Albrecht, R. F. Halothane vasodilation and nitric oxide in rat pial vessels. *J Neurosurg Anesthesiol* 1993; 5: 264-71
79. Kolominsky-Rabas, P. L. und Heuschmann, P. U. Inzidenz, Atiologie und Langzeitprognose des Schlaganfalls. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2002; 70: 657-62
80. Kowalski, C., Zahler, S., Becker, B. F., Flaucher, A., Conzen, P. F., Gerlach, E. und Peter, K. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology* 1997; 86: 188-95

81. Kubes, P., Ibbotson, G., Russell, J., Wallace, J. L. und Granger, D. N. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol* 1990; 259: G300-5
82. Kubes, P., Kurose, I. und Granger, D. N. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol* 1994; 267: H931-7
83. Kuroda, Y., Murakami, M., Tsuruta, J., Murakawa, T. und Sakabe, T. Blood flow velocity of middle cerebral artery during prolonged anesthesia with halothane, isoflurane, and sevoflurane in humans. *Anesthesiology* 1997; 87: 527-532
84. Kurose, I., Kubes, P., Wolf, R., Anderson, D. C., Paulson, J., Miyasaka, M. und Granger, D. N. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ Res* 1993; 73: 164-71
85. Larson, K. B., Markham, J. und Raichle, M. E. Tracer-kinetic models for measuring cerebral blood flow using externally detected radiotracers. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 443-63
86. Leder, L. D. Diagnostic experiences with the naphthol AS-D chloroacetate esterase reaction. *Blut* 1970; 21: 1-8
87. Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J. und Choi, D. W. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000; 106: 723-31
88. Lefer, A. M., Campbell, B., Scalia, R. und Lefer, D. J. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation* 1998; 98: 1322-1328
89. Lefer, D. J., Flynn, D. M. und Buda, A. J. Effects of a monoclonal antibody directed against P-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 270: H88-H98

90. Lehmborg, J., Beck, J., Baethmann, A. und Uhl, E. Bradykinin antagonists reduce leukocyte-endothelium interactions after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 441-8
91. Lembeck, F., Griesbacher, T., Eckhardt, M., Henke, S., Breipohl, G. und Knolle, J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 297-304
92. Levine, S. und Sohn, D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete circle of Willis. *Arch Pathol* 1969; 87: 315-7
93. Levy, D. E. und Brierley, J. B. Communications between vertebro-basilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp Neurol* 1974; 45: 503-8
94. Lindsey, C. J., Buck, H. S., Fior-Chadi, D. R. und Lapa, R. C. Pressor effect mediated by bradykinin in the paratrigeminal nucleus of the rat. *J Physiol* 1997; 502 (Pt 1): 119-29
95. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-568
96. Lorenzl, S., Koedel, U., Frei, K. und Pfister, H. W. Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996; 308: 335-41
97. Lorenzl, S., Koedel, U., Dirnagl, U., Ruckdeschel, G. und Pfister, H. W. Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1993; 168: 927-33
98. Lou, J., Donati, Y. R., Juillard, P., Giroud, C., Vesin, C., Mili, N. und Grau, G. E. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 1997; 151: 1397-1405

99. Lumenta, D. B., Plesnila, N., Klasner, B., Baethmann, A., Pruneau, D., Schmid-Elsaesser, R. und Zausinger, S. Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin B(2) receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2005:
100. Mahabeer, R., Naidoo, S. und Raidoo, D. M. Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis* 2000; 15: 325-35
101. Manegold, P. C., Hutter, J., Pahernik, S. A., Messmer, K. und Dellian, M. Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 2003; 101: 1970-1976
102. Marceau, F., Hess, J. F. und Bachvarov, D. R. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 357-386
103. Massberg, S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F. und Messmer, K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92: 507-15
104. Massberg, S., Enders, G., Matos, F. C., Tomic, L. I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Messmer, K. und Krombach, F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999; 94: 3829-38
105. Matsuo, Y., Onodera, H., Shiga, Y., Nakamura, M., Ninomiya, M., Kihara, T. und Kogure, K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994; 25: 1469-75
106. McIntosh, T. K., Smith, D. H. und Garde, E. Therapeutic approaches for the prevention of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13: 291-309
107. Mergenthaler, P., Dirnagl, U. und Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 151-67

108. Miletich, D. J., Ivankovich, A. D., Albrecht, R. F., Reimann, C. R., Rosenberg, R. und Mckissic, E. D. Absence of autoregulation of cerebral blood flow during halothane and enflurane anesthesia. *Anesth Analg* 1976; 55: 100-109
109. Miller, F. N., Sims, D. E., Schuschke, D. A. und Abney, D. L. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 1992; 44: 166-84
110. Miller, L. S., Morita, Y., Rangan, U., Kondo, S., Clemens, M. G. und Bulkley, G. B. Suppression of cytokine-induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules in vivo by general anesthesia. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996; 16: 147-54
111. Moloney, W. C., Mcpherson, K. und Fliegelman, L. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem* 1960; 8: 200-7
112. Mori, E., Del Zoppo, G. J., Chambers, J. D., Copeland, B. R. und Arfors, K. E. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 1992; 23: 712-8
113. Morii, S., Ngai, A. C. und Winn, H. R. Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide: with detailed description of the closed cranial window technique in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1986; 6: 34-41
114. Morisaki, H., Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Moro-Oka, S., Fukushima, K., Ishimura, Y. und Takeda, J. Leukocyte-endothelium interaction in the rat mesenteric microcirculation during halothane or sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1997; 87: 591-8
115. Morita, H., Nemoto, E. M., Bleyaert, A. L. und Stezoski, S. W. Brain blood flow autoregulation and metabolism during halothane anesthesia in monkeys. *Am J Physiol* 1977; 233: H670-H676

116. Mosinger, J. L. und Olney, J. W. Photothrombosis-induced ischemic neuronal degeneration in the rat retina. *Exp Neurol* 1989; 105: 110-3
117. Moudgil, G. C., Gordon, J. und Forrest, J. B. Comparative effects of volatile anaesthetic agents and nitrous oxide on human leucocyte chemotaxis in vitro. *Can Anaesth Soc J* 1984; 31: 631-7
118. Mrsulja, B. B., Mrsulja, B. J., Ito, U., Walker, J. T., Jr., Spatz, M. und Klatzo, I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta Neuropathol (Berl)* 1975; 33: 91-103
119. Mrsulja, B. B., Mrsulja, B. J., Spatz, M., Ito, U., Walker, J. T., Jr. und Klatzo, I. Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. IV. Behaviour of biogenic amines. *Acta Neuropathol (Berl)* 1976; 36: 1-8
120. Muraishi, M., Sayama, T., Matsukado, K., Inamura, T., Ikezaki, K., Morioka, T. und Fukui, M. Effect of intracarotid bradykinin infusion on cerebral blood flow in dogs. *Neurol Res* 1999; 21: 791-5
121. Murone, C., Paxinos, G., Mckinley, M. J., Oldfield, B. J., Muller-Esterl, W., Mendelsohn, F. A. und Chai, S. Y. Distribution of bradykinin B2 receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 1997; 381: 203-18
122. Murone, C., Perich, R. B., Schlawe, I., Chai, S. Y., Casley, D., Macgregor, D. P., Muller-Esterl, W. und Mendelsohn, F. A. Characterization and localization of bradykinin B2 receptors in the guinea-pig using a radioiodinated HOE140 analogue. *Eur J Pharmacol* 1996; 306: 237-47
123. Nash, G. B., Jones, J. G., Mikita, J., Christopher, B. und Dormandy, J. A. Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 1988; 70: 171-6

124. Nishimura, H., Naritomi, H., Iwamoto, Y., Tachibana, H. und Sugita, M. In vivo evaluation of antiplatelet agents in gerbil model of carotid artery thrombosis. *Stroke* 1996; 27: 1099-1103
125. Nobis, U., Pries, A. R., Cokelet, G. R. und Gaehtgens, P. Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvasc Res* 1985; 29: 295-304
126. Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S. und Messmer, K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15: 244-9
127. Nunn, J. F. und O'morain, C. Nitrous oxide decreases motility of human neutrophils in vitro. *Anesthesiology* 1982; 56: 45-8
128. Ogletree, M. L. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂. *Fed Proc* 1987; 46: 133-138
129. Olesen, S. P. Leakiness of rat brain microvessels to fluorescent probes following craniotomy. *Acta Physiol Scand* 1987; 130: 63-8
130. Orawski, A. T. und Simmons, W. H. Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides* 1989; 10: 1063-73
131. Pawlik, G., Rackl, A. und Bing, R. J. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res* 1981; 208: 35-58
132. Perry, D. C. und Snyder, S. H. Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 43: 1072-80
133. Plesnila, N., Schulz, J., Stoffel, M., Eriskat, J., Pruneau, D. und Baethmann, A. Role of bradykinin B₂ receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 2001; 18: 1049-58

134. Prieto, A. R., Ma, H., Huang, R., Khan, G., Schwartz, K. A., Hage-Korban, E. E., Schmaier, A. H., Davis, J. M., Hasan, A. A. und Abela, G. S. Thrombostatin, a bradykinin metabolite, reduces platelet activation in a model of arterial wall injury. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 984-92
135. Qadri, F., Baurle, L., Hauser, W., Rascher, W. und Dominiak, P. Centrally bradykinin B2-receptor-induced hypertensive and positive chronotropic effects are mediated via activation of the sympathetic nervous system. *J Hypertens* 1999; 17: 1265-71
136. Raidoo, D. M. und Bhoola, K. D. Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol* 1997; 77: 39-44
137. Raidoo, D. M. und Bhoola, K. D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 105-27
138. Raidoo, D. M., Ramchurren, N., Naidoo, Y., Naidoo, S., Muller-Esterl, W. und Bhoola, K. D. Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology* 1996; 33: 104-7
139. Rechavia, E. und Wurzel, M. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in acute myocardial infarction associated with thrombotic occlusion of the left main coronary artery. *Circulation* 1998; 98: 1249-1250
140. Reed, M. W. und Miller, F. N. Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 1988; 36: 104-7
141. Regoli, D. und Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32: 1-46

142. Regoli, D., Barabe, J. und Park, W. K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; 55: 855-67
143. Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A. und Gobeil, F. J. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 1998; 348: 1-10
144. Regoli, D., Pheng, L. H., Allogho, S. N., Nguyen-Le, X. K. und Gobeil, F. Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology* 1996; 33: 24-31
145. Relton, J. K., Beckey, V. E., Hanson, W. L. und Whalley, E. T. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1997; 28: 1430-6
146. Rerkpattanapit, P., Kotler, M. N. und Yazdanfar, S. Images in cardiovascular medicine. Rapid dissolution of massive intracoronary thrombosis with platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor. *Circulation* 1999; 99: 2965
147. Rosenblum, W. I. und El Sabban, F. Platelet aggregation and vasoconstriction in undamaged microvessels on cerebral surface adjacent to brain traumatized by a penetrating needle. *Microvasc Res* 1978; 15: 299-307
148. Rosenblum, W. I. und El-Sabban, F. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, hydroxyl radical scavengers, impair platelet aggregation within and eliminate the accompanying vasodilation of, injured mouse pial arterioles. *Stroke* 1982; 13: 35-9
149. Rosenblum, W. I. und El-Sabban, F. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents. *Circ Res* 1977; 40: 320-8
150. Rovainen, C. M., Woolsey, T. A., Blocher, N. C., Wang, D. B. und Robinson, O. F. Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomic-

roscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 359-371

151. Ruggeri, Z. M. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol* 1994; 31: 229-239

152. Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J., Brown, J. D., Carbin, G. L. und Sokoloff, L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol* 1978; 234: H59-66

153. Santiago, J. A., Garrison, E. A. und Kadowitz, P. J. Analysis of responses to bradykinin: effects of Hoe-140 in the hindquarters vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 1994; 267: H828-36

154. Schmid-Schonbein, G. W. und Engler, R. L. Perspectives of leukocyte activation in the microcirculation. *Biorheology* 1990; 27: 859-69

155. Scicli, A. G., Forbes, G., Nolly, H., Dujovny, M. und Carretero, O. A. Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A* 1984; 6: 1731-8

156. Seno, T., Inoue, N., Gao, D., Okuda, M., Sumi, Y., Matsui, K., Yamada, S., Hirata, K. I., Kawashima, S., Tawa, R., Imajoh-Ohmi, S., Sakurai, H. und Yokoyama, M. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. *Thromb Res* 2001; 103: 399-409

157. Shetler, T. J., Bailey, B. D., Jakubowski, J. A. und Jackson, C. V. Intravenous administration of the glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonist 7E3 induces reperfusion of an acute thrombotic occlusion of the canine coronary artery. *Thromb Res* 1998; 90: 95-100

158. Shi, B., Bhat, G., Mahesh, V. B., Brotto, M., Nosek, T. M. und Brann, D. W. Bradykinin receptor localization and cell signaling pathways used by bradykinin in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1999; 140: 4669-76

159. Shi, B., Mahesh, V. B., Bhat, G. K., Ping, L. und Brann, D. W. Evidence for a role of bradykinin neurons in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 209-18
160. Shigematsu, S., Ishida, S., Gute, D. C. und Korthuis, R. J. Bradykinin prevents postischemic leukocyte adhesion and emigration and attenuates microvascular barrier disruption. *Am J Physiol* 1999; 277: H161-71
161. Shigematsu, S., Ishida, S., Gute, D. C. und Korthuis, R. J. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. *Am J Physiol* 1999; 277: H152-60
162. Shimakura, A., Kamanaka, Y., Ikeda, Y., Kondo, K., Suzuki, Y. und Umemura, K. Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2000; 858: 55-60
163. Siesjo, B. K. und Siesjo, P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13: 247-68
164. Springer, T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34
165. Stanimirovic, D. und Satoh, K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 2000; 10: 113-26
166. Steinbauer, M., Harris, A. G., Leiderer, R., Abels, C. und Messmer, K. Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 1998; 9: 345-51
167. Steinbauer, M., Harris, A. G. und Messmer, K. Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 1997; 272: H1710-6

168. Stern, M. D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975; 254: 56-8
169. Stover, J. F., Dohse, N. K. und Unterberg, A. W. Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg* 2000; 92: 853-9
170. Suzuki, H., Abe, K., Tojo, S., Kimura, K., Mizugaki, M. und Itoyama, Y. A change of P-selectin immunoreactivity in rat brain after transient and permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Res* 1998; 20: 463-9
171. Svensjo, E. und Arfors, K. E. Dimensions of postcapillary venules sensitive to bradykinin and histamine-induced leakage of macromolecules. *Ups J Med Sci* 1979; 84: 47-60
172. Svensjo, E., Arfors, K. E., Raymond, R. M. und Grega, G. J. Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux. *Am J Physiol* 1979; 236: H600-6
173. Tayeh, M. A. und Scicli, A. G. Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 412-21
174. Theilen, H., Schrock, H. und Kuschinsky, W. Capillary perfusion during incomplete forebrain ischemia and reperfusion in rat brain. *Am J Physiol* 1993; 265: H642-8
175. Tiffany, C. W. und Burch, R. M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett* 1989; 247: 189-92

176. Uhl, E., Beck, J., Stummer, W., Lehmberg, J. und Baethmann, A. Leukocyte-endothelium interactions in pial venules during the early and late reperfusion period after global cerebral ischemia in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 979-87
177. Uhl, E., Pickelmann, S., Baethmann, A. und Schurer, L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Systemic application. *Stroke* 1999; 30: 873-879
178. Uhl, E., Pickelmann, S., Rohrich, F., Baethmann, A. und Schurer, L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. *Stroke* 1999; 30: 880-886
179. Unterberg, A., Dautermann, C., Baethmann, A. und Muller-Esterl, W. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J Neurosurg* 1986; 64: 269-76
180. Unterberg, A., Wahl, M. und Baethmann, A. Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984; 4: 574-85
181. Villringer, A., Haberl, R. L., Dirnagl, U., Anneser, F., Verst, M. und Einhaupl, K. M. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 1989; 504: 159-60
182. Wahl, M., Schilling, L., Unterberg, A. und Baethmann, A. Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 57: 64-72
183. Wahl, M., Unterberg, A., Baethmann, A. und Schilling, L. Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8: 621-34

184. Wahl, M., Whalley, E. T., Unterberg, A., Schilling, L., Parsons, A. A., Baethmann, A. und Young, A. R. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 1996; 33: 257-63
185. Wass, C. T. und Lanier, W. L. Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 801-12
186. Wayland, H. und Johnson, P. C. Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J Appl Physiol* 1967; 22: 333-7
187. Weyrich, A. S., Elstad, M. R., Mcever, R. P., McIntyre, T. M., Moore, K. L., Morrissey, J. H., Prescott, S. M. und Zimmerman, G. A. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 1996; 97: 1525-1534
188. Whalley, E. T., Amure, Y. O. und Lye, R. H. Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar artery in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 335: 433-7
189. Whalley, E. T., Fritz, H. und Geiger, R. Kinin receptors and angiotensin converting enzyme in rabbits basilar arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1983; 324: 296-301
190. Whittle, I. R., Piper, I. R. und Miller, J. D. The role of bradykinin in the etiology of vasogenic brain edema and perilesional brain dysfunction. *Acta Neurochir (Wien)* 1992; 115: 53-9
191. Williams, P. C., Stern, M. D., Bowen, P. D., Brooks, R. A., Hammock, M. K., Bowman, R. L. und Di Chiro, G. Mapping of cerebral cortical strokes in Rhesus monkeys by laser Doppler spectroscopy. *Med Res Eng* 1980; 13: 3-5
192. Wirth, K., Hock, F. J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H. G., Anagnostopoulos, H., Henk, S., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J. und Et Al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 774-7

193. Xu, J., Hsu, C. Y., Junker, H., Chao, S., Hogan, E. L. und Chao, J. Kininogen and kinin in experimental spinal cord injury. *J Neurochem* 1991; 57: 975-80
194. Yamakawa, T., Yamaguchi, S., Niimi, H. und Sugiyama, I. White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study. *Circ Shock* 1987; 22: 323-32
195. Zausinger, S., Lumenta, D. B., Pruneau, D., Schmid-Elsaesser, R., Plesnila, N. und Baethmann, A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2002; 950: 268-78
196. Zhang, R., Chopp, M., Zhang, Z., Jiang, N. und Powers, C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1998; 785: 207-14
197. Zhang, S. P. und Codd, E. E. Characterization of bradykinin receptors in human lung fibroblasts using the binding of ^3H [Des-Arg¹⁰,Leu⁹]kallidin and ^3H NPC17731. *Life Sci* 1998; 62: 2303-14
198. Zimmerman, G. A., Elstad, M. R., Lorant, D. E., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Topham, M. K., Weyrich, A. S. und Whatley, R. E. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 1996; 416: 297-304
199. Zucker, M. B. und Nachmias, V. T. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 2-18

7 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

7.1 Abstracts

Waldner, M., Hutter, J., Uhl, E., Baethmann, A. und Lehmberg, J. A novel model of platelet-endothelium interactions in cerebral microcirculation using intravital fluorescence microscopy.

J Cereb Blood Flow Metab 2003; 23, suppl. 1

7.2 Originalarbeiten

Waldner, M., Hutter, J., Uhl, E., Baethmann, A. und Lehmberg, J. Modified labeling technique for in vivo visualization of platelets in the cerebral microcirculation of Mongolian gerbils.

J Cereb Blood Flow Metab 2007; 27(2):327-33. Epub 2006 May 24

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians Universität, München (ehemaliger Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, aktueller kommissarischer Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl) in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie von Professor Dr. med. A. Baethmann durchgeführt. Das Projekt wurde durch Fördermittel der Friedrich-Baur-Stiftung unterstützt.

Herrn Prof. Messmer danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut. Die kollegiale Atmosphäre und professionelle wissenschaftliche Arbeit in diesem Institut motivierten mich stets.

Herrn Prof. Baethmann möchte ich besonders für die Integration in seine Arbeitsgruppe danken. Er zeigte einen bewundernswerten Einsatz hinsichtlich der wissenschaftlichen Ausbildung der Doktoranden und Assistenten und war durch seine konstruktive Kritik und seine langjährige Erfahrung immer eine wichtige Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD. Dr. med. E. Uhl und Dr. med. J. Lehmberg die mir das Thema zur Verfügung gestellt und mich während der Durchführung der gesamten Doktorarbeit begleitet haben. Sie unterstützten mich bei den ersten Schritten der medizinischen Forschung und standen mir bei Problemen jederzeit bei. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft war und ist mir ein Vorbild, ihre Art des wissenschaftlichen Denkens prägte mich maßgeblich.

Herrn Prof. Dr. N. Plesnila und Dr. rer. biol. hum. J. Peters und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurochirurgie danke ich für die kameradschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Frau Veronika Bischoff danke ich für die sorgfältige Anfertigung der histologischen Präparate und Frau Annemarie Allmeling für die Unterstützung bei der Isolation und Färbung der Thrombozyten.

Nicht zuletzt möchte ich der Unterstützung der DFG durch die Teilnahme am Graduiertenkolleg „Neurotraumatologie und neurophysiologische Rehabilitation“ GRK 688 als Stipendiat danken. Die Zusammenführung unterschiedlicher Arbeitsgruppen erlaubte beispielhafte Einblicke in verschiedene wissenschaftliche Bereiche. Die regelmäßigen wissenschaftlichen Veranstaltungen ermöglichten eine Ausbildung aller Teilaspekte wissenschaftlichen Arbeitens.

9 Lebenslauf

Maximilian Josef Waldner

Geburtsort: Traunstein
Geburtsdatum: 11. Februar 1978
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Religion: Römisch-katholisch
Eltern: Sibylle Waldner, Architektin
Prof. Dr. med. Helmut Waldner, Chirurg

Schulbildung

1988-1997 Maximiliansgymnasium, München
Apr. 1989 - Sept. 1989 Schulaufenthalt in Boston, Massachusetts
Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1997-1998 Lagerungspfleger in den Operationssälen der Poliklinik des Klinikums Innenstadt der LMU

Hochschulbildung

Nov. 1998 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 2000 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit Juli 2005 Assistenzarzt der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Direktor: Prof. Dr. med. P. R. Galle