Aus der Neurologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching
(Chefarzt apl. Prof. Dr. med. Roman L. Haberl)
und der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt FRCP)

Die Rolle von L-Arginin/Stickstoffmonoxid und Kohlendioxid bei der Regulation der Durchblutung in der Penumbra bei der experimentellen transienten fokalen zerebralen Ischämie

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

vorgelegt von
K. Helge Martens
aus München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	apl. Prof. Dr.med. Roman L. Haberl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Baethmann
	Prof. Dr. J.-C. Tonn
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. B. Sporer
Dekan:	Prof.Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2003

Meinem Vater Dipl.Ing. Klaus W. Martens gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

1.1. Therapieziele beim Schlaganfall
1.2. Die Regulation der lokalen zerebralen Durchblutung
1.2.1. Die Faktoren in der physilogischen Regulation der zerebralen Mikrozirkulation
1.2.1.1. Die lokal-chemischen/parenchymalen Faktoren
1.2.1.2. Die Autacoide
1.2.1.3. Die Neurotransmitter der perivaskulären Nerven
1.2.1.4. Die endothelialen Faktoren
1.3. Der Effekt der Aminosäure Arginin auf die zerebrale Durchblutung
1.4. Stickstoffmonoxide (NO) und Stickstoffmonoxidesynthase (NOS) in der Regulation des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF)
1.4.1. Allgemeines
1.4.2. Isoenzyme der NO-Synthase
1.4.2.1. NOS-Isoform I (nNOS)
1.4.2.2. NOS-Isoform II (iNOS)
1.4.2.3. NOS-Isoform III (eNO)
1.5. Kohlendioxid (CO_2) in der Regulation des zerebralen Blutflusses (rCBF)
1.6. Fragestellungen

2. Material und Methoden

2.1. Charakterisierung des Tiermodells
2.1.1. Präparationsbeschreibung
2.1.2. Meßeinrichtungen und Meßverfahren
2.1.2.1. Vitalparameter
2.1.2.2. Messung der CO_2-Reaktivität zerebraler Gefäße
2.1.2.3. Die Laser-Doppler-Blutflußmethode
2.1.3. Eingesetzte Substanzen
2.2. Versuchsprotokolle
2.3. Versuchsdurchführung
2.4. Statistische Methoden

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Parameter
3.2. Der Einfluß von L-Arginin auf den rCBF in der Reperfusion bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie mit einer 5- und 20-minütigen Ischämie
3.3. Der Verlauf des LDF/rCBF während Ischämie und Reperfusion mit und ohne L-NA-Vorbehandlung
3.4. Der Einfluß von CO_2 auf den rCBF bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie mit einer 5- und 20-minütigen Ischämie

4. Diskussion

4.1 Allgemein
4.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit
4.1.2. Validität und Grenzen des verwendeten Tiermodells bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie
4.1.3. Validität und Grenzen der zerebralen Blutflußmessung mittels der Lase-Doppler-Methode
4.2 Der Einfluß von L-Arginin/Stickstoffmonoxid, N^{Ω}-nitro-L-Arginin und der Hyperkapnie auf den zerebralen Blutfluß bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie mit unterschiedlichen Ischämiezeiten
4.2.1. Der Einfluß von exogen zugeführtem L-Arginin auf den regionalen zerebralen Blutfluß
4.2.2. Die Wirkung von exogen zugeführtem L-Arginin nach einer zerebralen Ischämie
4.2.3. Die NO-Produktion in einem ischämischen Gewebe nach einer längerdauernden Ischämie
4.2.4. Hypothese: Hemmen NO-Metaboliten die L-Arginin-Antwort in der Reperfusion?

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Danksagungen

8. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Therapieziele beim Schlaganfall

In der klinischen Akuttherapie wird angestrebt, das ischämische Hirn d.h. die Zahl der Neurone und Gliazellen, die irreparabel geschädigt sind, so klein wie möglich zu halten. Eines der therapeutischen Ziele ist es dabei, die Durchblutung im betroffenen ischämischen Gebiet zu verbessern.

Nach gängigem Konzept geht man von verschiedenen Zonen im durchblutungsgestörtem Versorgungsareal einer verschlossen Hirnarterie aus. So befindet sich im Zentrum ein als Core (Kern) bezeichnetes Gebiet, in dem sich schon innerhalb der ersten Stunde infarziertes Gewebe histologisch nachweisen läßt (Touho et al., 1996) und in dem ein regionaler Blutfluß (rCBF) von kleiner gleich 6 cm^3/100g Gewebe/min gemessen wird (Kaufmann et al., 1999). Dieses Areal korreliert mit der kleinsten Ausdehnung der endgültigen Infarktgröße (Kaufmann et al., 1999). Um diesen ischämischen Kern herum besteht ein mehr oder weniger schmaler Randsaum, die sogenannte Penumbra (Astrup et al., 1981). Astrup et al. definieren die Penumbra als ein Areal mit einer moderaten Ischämie, in dem der Funktionsstoffwechsel (die elektrische Aktivität und Leitfähigkeit) des Gewebes eingeschränkt oder gar erloschen ist, aber dessen Grund- oder Erhaltungsstoffwechsel und die Membranfunktion noch intakt ist. Dieses Gewebe kann überleben und seine normale neurologische Funktion wieder übernehmen, wenn innerhalb von einigen Stunden (hier ist die genaue Dauer noch Gegenstand kontroverser Diskussion, der Bereich liegt zwischen 2-8h) durch geeignete therapeutische Maßnahmen ein normaler CBF wiederhergestellt wird (Touho et al., 1996). Die Durchblutungsraten des CBF liegen in der Penumbra zwischen 7 und 20 cm^3/100g Gewebe/min (Kaufmann et al., 1999). Dabei ist das gesamte ischämische Gebiet kein statisches Gebilde, sondern macht in den ersten 12h der Ischämie Veränderungen durch, d.h. die Grenzen der unterschiedlichen Durchblutung des Gewebes sind fließend. So haben sich in den letzten Jahren zwei verschiedene Ansätze in der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls herauskristallisiert. Zum einen der neurovaskuläre Ansatz im Sinne einer Wiederherstellung der Durchblutung des betroffenen Gebietes und damit der Wiederherstellung der Versorgung mit Energie und Sauerstoff, zum anderen der neuroprotektive Ansatz im Sinne einer Protektion des neuronalen und glialen Gewebes. Dabei kann der neurovaskuläre Ansatz in zwei Teilaspekten unterschieden werden. Zum einen in der Verbesserung der Durchblutung durch den Versuch der Wiedereröffnung eines großen Hirngefäßes mittels der Thrombolyse oder die Verbesserung der lokalen Durchblutung in der Penumbra durch eine Vasodilatation der Gefäße in der ischämischen Region. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß der exogen zugeführten

Aminosäure L-Arginin auf die lokale zerebrale Durchblutung in der Penumbra bei einer transienten fokalen Ischämie als einem Teilaspekt des neurovaskulären Ansatzes.

1.2. Die Regulation der lokalen zerebralen Durchblutung

1.2.1. Die Faktoren in der physiologischen Regulation der zerebralen Mikrozirkulation

Nach dem Ohm`schen Gesetz ist der Blutfluß einerseits vom Perfusionsdruck und andererseits vom Gefäßwiderstand abhängig. Ein Sonderfall bildet der zerebrale Blutfluß, da dieser in einem Bereich von 80-180 mmHg unabhängig vom Perfusionsdruck ist. Man bezeichnet dies als zerebrale Autoregulation des Hirnes (Unterberg et Wahl, 1992). In der Autoregulation wird durch myogene Mechanismen bei sich ändernden Perfusionsdruck und gleichbleibenden Bedarf an Sauerstoff und Substraten, der zerebrale Blutfluß konstant gehalten. Dies konnte zuerst von Harder bei Katzen gezeigt werden (Harder, 1984).

Der Gefäßwiderstand kann durch lokal-chemische (parenchymale) und endotheliale Faktoren, durch Autacoide und durch die Ausschüttung von Transmittern aus perivaskulären Nerven beeinflußt werden (Wahl et Schilling, 1993).

1.2.1.1. Die lokal-chemischen/parenchymalen Faktoren

Bei der lokal-chemischen Regulation der Durchblutung werden je nach Funktionsumfang und Metabolismus des Hirngewebes, insbesondere der Neurone lokal-chemisch wirksame Faktoren, wie Kohlendioxid (CO_2), Wasserstoffionen (H^+), Kaliumionen (K^+), Calciumionen (Ca^{2+}), Adenosin und die Osmolarität der Extrazellulärflüssigkeit, von den Zellen aufgenommen oder ausgeschieden, was eine Änderung der Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit nach sich zieht (Kuschinsky et Wahl, 1978). Dies führt zu einer Änderung des Membranpotentials und der Membranleitfähigkeit, die wiederum zu einer Kontraktion oder Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. Ein solcher Mechanismus würde eine regional enge Kopplung zwischen den Zellen des Parenchyms und dem Blutbedarf ermöglichen.

1.2.1.2. Die Autacoide

Die Klasse der Autacoide wie Bradykinin, Histamin, Eicosanoide wie Prostanoide und Leukotriene und ihr Verläufer Arachidonsäure und Serotonin beeinflußt den zerebrovaskulären Widerstand, die Kapazitätsgefäße und die Permeabilität der Bluthirnschranke. Bradykinin erweitert dosisabhängig über den B_2-kinergen Rezeptor zerebrale Arterien. Diese Dilatation ist endothelabhängig und kann durch verschiedene

endotheliale Faktoren beeinflußt werden. Histamin kann von Mastzellen und der Gefäßwand ausgeschüttet werden, dabei wirkt es als Neurotransmitter oder als Transmitter der perivaskulären Nerven (Schilling et Wahl, 1993). Eine perivaskuläre Applikation von Histamin erweitert die extraparenchymalen Gefäße über den H_2-Rezeptor. Intravaskulär appliziertes Histamin verändert den CBF nicht, da es nicht die Bluthirnschranke überwinden kann, jedoch kann über den H_2-Rezeptor die Permeabilität der Bluthirnschranke verändert werden (Schilling et Wahl, 1993). Eicosanoide und ihre Vorläufersubstanz Arachidonsäure werden durch das Parenchym und teilweise von der Gefäßwand unter pathologischen Zuständen ausgeschüttet. Zusätzlich öffnet lokal applizierte Arachidonsäure die Bluthirnschranke und ermöglicht es anderen vasoaktiven Substanzen auf den rCBF Einfluß zu nehmen (Unterberg et Wahl, 1992). Leukotriene und Thromboxan A_2 sind potente Vasokonstriktoren der zerebralen Arterien und sind möglicherweise an der Entstehung des Vasospasmus nach einer subarachnoidalen Blutung beteiligt (Unterberg et al., 1991).

1.2.1.3. Die Neurotransmitter der perivaskulären Nerven

Die zerebralen Arterien sind von verschiedenen Nerven innerviert. Die sympathico-noradrenergen Fasern entspringen dem Ganglion cervicale superior und schütten die Transmitter Noradrenalin (NE) und Neuropeptid Y (NPY) aus. Dabei scheint eine Stimulation dieser Nervenfasern die Grenzen der Autoregulation zu verschieben (MacKenzie et Scatton, 1987). Die parasympathico-cholinergen Fasern entspringen hauptsächlich dem Ganglion sphenopalatina und Ganglion oticum und erhöhen den rCBF durch die Ausschüttung der dilatatorisch wirksamen Transmitter Acethylcholin (Ach) und des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) (Seylaz et al., 1988). Neurone und Blutgefäße des Cortex scheinen über aminerge Fasern und den Transmittern Noradrenalin (NE) und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) mit dem Hirnstamm verbunden zu sein (MacKenzie et Scatton, 1987). Andererseits gibt es jedoch auch Berichte, die die serotonerge Innervation in Frage stellen (Chang et al., 1990). Auch wenn beschrieben wird, daß dieses Fasersystem die vaskuläre Permeabilität ändert (Raichle et al., 1975) oder Einfluß auf die vasomotorische Antwort nehmen soll (Bonvento et al., 1991) ist jedoch der genaue Funktionmechanismus noch ungeklärt (Adachi et al., 1992). Extraparenchymale Hirnarterien sind noch durch Fasern, die dem Ganglion trigeminale entspringen und die dilatatorisch wirksamen Transmitter Substanz P (SP), Calcitonin, gene related peptide (CGRP) und Neurokinin (NKA) ausschütten innerviert (Hardebo et al., 1991). Diese Fasern scheinen eine Steigerung der Durchblutung bei kortikaler Aktivierung auszulösen (Sakas et al., 1989).

1.2.1.4. Die endothelialen Faktoren

Das Endothelium spielt in der Regulation des rCBF durch die Beeinflussung der glatten Gefäßmuskulatur eine wichtige Rolle (Furchgott et Zawadzki, 1980). Dabei führt eine Konformationsänderung der Guanylatzyklase zu einer Konzentrationsänderung des intrazellulären Calziums und nachfolgend zu einer Konstriktion oder Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle. Durch verschiedene Reize und/oder Substanzen wie z. B. Scherstreß, Autacoide und Neurotransmitter wie Acethylcholin (Ach) und Noradrenalin (NA) werden von den Endothelzellen mehrere dilatierende und konstringierende Faktoren ausgeschüttet. Die konstriktorisch wirksamen Faktoren sind Endothelin (ET), Thromboxan A_2 (TxA_2) und der Endothelium-derived-constricting-factor (EDCF) (Katusic et al., 1988). Dilatatorisch wirksam sind Endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF), der als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden konnte, Prostazyklin (PGI_2) (Parsons et al., 1991a) und der Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF) (Katusic et al., 1988). Zusätzlich kann Stickstoffmonoxid von Neurotransmittern wie Acetylcholin (Ach) und Substanz P oder Autacoide wie Bradykinin oder 5-Hydroxytryptamine (5-HT) (Parson et al., 1991b) oder durch physikalische Stimuli wie z.B. Scherstreß ausgeschüttet werden. Stickstoffmonoxid kann nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von der glatten Gefäßmuskelzelle selbst (Schini et Vanhoutte, 1991), sowie von Neuronen und Astrozyten (Förstermann et al., 1991b) und perivaskulären Nerven (Toda et Okamura, 1991) ausgeschüttet werden.

1.3. Der Effekt der Aminosäure Arginin auf die zerebrale Durchblutung

Es konnte in vitro und in vivo bei gesunden Organismen gezeigt werden, daß die exogene Zufuhr von L-Arginin eine mäßige vaskuläre Dilatation verursacht. L-Arginin konnte neben anderen biologischen Effekten wie Proteinsynthese oder die Detoxifikation von Ammoniak, als Substrat für die Synthese des potenten Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen identifiziert werden (Palmer et al., 1988).

Beim Schlaganfall konnten Morikawa et al. zeigen, daß die Gabe von L-Arginin bei unterschiedlichen Infarktmodellen der Ratte und verschiedenen Applikationszeitpunkten die Infarktgröße reduziert (Morikawa et al., 1992a). Diese Infarktreduktion durch L-Arginin könnte über eine Vasodilatation distal des Verschlusses durch NO zustande gekommen sein, da L-Arginin den Durchmesser pialer Gefäße steigert (Morikawa et al., 1992b). NO gilt als Mediator der endothelabhängigen Vasodilatation und bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle über einen Guanosinmonophosphat (3´:5`-zyklisches GMP)-

abhängigen Mechanismus (Moncada et al., 1991). Diese Befunde konnten bei verschieden Rattenspezies (normo- und hypertensive) und Applikationszeitpunkten (prae- und postischämisch) bestätigt werden (Morikawa et al., 1994). Reutens et al. konnten bei gesunden Erwachsenem zeigen, daß L-Arginin die Ruhedurchblutung steigern konnte. Eine weitere Steigerung des zerebralen Blutflusses unter taktiler nervaler Aktivierung war jedoch durch L-Arginin nicht möglich (Reutens et al., 1996).
Bei einem Modell eines leichten Schädelhirntraumas konnte L-Arginin die CO_2-Reaktivität d.h. Integrität der Gefäßantwort größtenteils wiederherstellen. Als Erklärung wird eine zweifache Wirkung postuliert. Erstens als eine Erhöhung des Substratangebotes für die NO-Synthasen zur Produktion von NO, das zur einer Steigerung der Durchblutung führt. Zweitens soll L-Arginin eine Funktion als Radikalfänger haben. Die Doppelwirkung von L-Arginin wird von den Autoren postuliert, da weder NO-Donatoren noch Radikalfänger allein den selben Effekt haben (Golding et al., 2000).

1.4. Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) in der Regulation des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF)

1.4.1. Allgemeines

Die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) (EC 1.14.13.39) katalysiert die Reaktion des Substrates L-Arginin mit molekularen Sauerstoff als Cosubstrat zu Stickstoffmonoxid (NO) mit dem Coprodukt L-Citrullin. Zusätzlich werden Nicotinamidadenindinucleotid (NADPH), Biopterin als 6(R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, Flavinadenindinucleotid (FAD) und Flavinadeninmononucleotid (FMN) als Cofaktoren benötigt (Hevel et al., 1992).

Calmodulin

↓

NO-Synthase

↓

$$\text{L -Arginin} + O_2 \leftrightarrow \text{L-Citrullin} + \text{NO}$$

↑

NADPH, Biopterin, FAD, FMN

Die NO-Synthase besteht aus zwei Domänen, einer Reduktasedomaine und einer Oxygenasedomaine, die das katalytische Zentrum enthält. Die beiden Domänen sind über eine Sequenz an der Calmodulin binden kann miteinander verbunden. Die Bindung von

Calmodulin ist essentiell für die Aktivität der NOS. Für die Bindung von Calmodulin ist wiederum Calcium nötig (Szabo, 1996).

Bis jetzt wurden drei Isoenzyme der NO-Synthase (EC 1.14.13.39) identifiziert. Sie werden in der Reihenfolge ihrer Purifikation und der ersten Isolation ihrer cDNA als Isoform I, II oder III benannt (Förstermann et al., 1994). Beim Menschen kodieren die unterschiedlichen Isoenzyme auf unterschiedlichen Genen. Isoform I codiert auf Chromosom 12 (Genort 12q24.2→24.31), Isoform II auf Chromosom 17 (Genort 17p11→17q11) und Isoform III auf Chromosom 7 (Genort 7q35→7q36) (Xu et al., 1993). Die Michaelis-Konstante (Km) für die einzelnen Isoformen der NO-Synthase werden mit 1.4 bis 2.2 μmol/L für Isoform I (Bredt et al., 1990), 2.8, 16 und 32.3 μmol/L für Isoform II (Yui et al., 1991) und 2.9 μmol/L für Isoform III (Pollock et al., 1991) beschrieben.

1.4.2. Isoenzyme der NO-Synthase

1.4.2.1. NOS-Isoform I (nNOS)

In der Literatur wird die Isoform I auch als b-NOS (brain NO synthase), c-NOS (constitutive oder Ca 2+-regulated NO synthase), bc-NOS (combination of both) oder n-NOS (neuronal NO synthase) bezeichnet.

Isoform I ist konstitutiv in neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems z.B. bestimmten Zellen im Rückenmark, in Ganglienzellen des Sympathikus und im neuronalen Zellen des Nebennierenmarkes und in peripheren nitrinergen Nerven und in gewissen Epithelzellen z.B. der Lunge, des Uterus und des Magens, der Macula densa Zellen der Niere und den Inselzellen des Pankreas (Schmidt HHHW et al., 1992) aktiv.

Die Aktivität der Isoform I wird durch die intrazelluläre Calciumkonzentration und durch Calmodulin reguliert . Die Phosphorilierung der Isoform I durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C und die Calcium-abhängige Calmodulinproteinkinase II bewirkt eine Reduzierung der Aktivität des Enzyms (Nakane et al., 1991 und Bredt et al., 1992). Das Enzym ist bei einer Konzentration von 100 nmol/l Calcium inaktiv und erreicht seine volle Aktivität bei einer Konzentration von 500nmol/l Calcium (Förstermann et al., 1990). Dieser Bereich liegt über der typischen intrazellulären Calciumkonzentration für die Rezeptorstimulation von exzitatorischen Zellen wie z.B. Neuronen (Dawson et al., 1993). Höhere Calciumkonzentrationen können jedoch im Rahmen einer zerebralen Ischämie erreicht werden. Ob dieser pathologische Zustand Einfluß auf die Enzymregulation hat ist ungeklärt.

Im Gehirn wird das von der NO-Synthase Isoform I produzierte NO bei der zerebralen Ischämie mit der Neurotoxizität in Verbindung gebracht (Samdani et al., 1997).

In Kulturen von kortikalen Neuronen, in denen Isoform I in gleichen Mengen exprimiert wird wie in vivo, wird die durch Glutamat und den NMDA-Rezeptor verursachte Neurotoxizität durch ein Übermaß an NO oder dessen Produkte verursacht. Wenn diese Kulturen mit NMDA und L-Argininanaloga oder NOS-Inhibitoren behandelt werden, ist eine Neuroprotektion gegen die NMDA-Neurotoxizität nachweisbar (Dawson et al., 1996). Es wird auch eine von NO unabhängige NMDA-Toxizität von Leker et al. mit Dexanabinol, einem künstlichen Cannabinoid und NMDA-Rezeptor-Antagonisten in Bezug auf die Infarktgröße beschrieben (Leker et al., 1999)). Wie Versuche mit NO-Donatoren zeigen kann sich NO genauso toxisch wie NMDA selber verhalten und die von NMDA anstoßbare Kaskade der Neurotoxizität anstoßen. Die Gabe von NO-Donatoren wie z.B. 3-Morpholinosyndnoniminhydrochlorid oder NOC-18,DETA/NO ((Z)-1-(2(2-aminoethyl-)-N-(2-ammonioethyl)amino)diazen-1-i um-1,2-diolat) zeigen nur geringe oder keine Reduktion des Infarktvolumens (Coert et al., 1999). Bei primären Neuronenkulturen, die transgen verändert wurden, so daß sie keine NOS Isoform I mehr besitzen läßt sich eine Resistenz gegen die NMDA-Neurotoxizität zeigen. Dies legt den Schluß nahe, daß NOS Isoform I die Quelle des neurotoxischen NO ist (Dawson et al. 1996). Der neuronale Schaden bei Neuronenkulturen, verursacht durch den Entzug von Sauerstoff und Energie (Glukose→ATP), das den Zustand einer Ischämie initiiert, wird von NOS-Inhibitoren vermindert. Auch die Neuronenkulturen von NOS Isoform I Null-Mäusen sind im Gegensatz zu Neuronenkulturen von wild-type-Mäusen resistenter gegen den Entzug von Sauerstoff und Energie (Dawson et al., 1996).

Beim middle-cerebral-artery-Okklusionsmodell (MCA-O) verschiedener Tierspezies (Mäusen, Ratten und Katzen) reduziert die Hemmung der NOS Isoform I durch Inhibitoren ,die die Aktivität der NOS Isoform III nicht beeinflußen, das Infarktvolumen (Dalkara et al., 1994; Iadecola et al., 1997; Dawson, 1994; Coert et al., 1999). Selektive NOS Isoform I Inhibitoren, wie 7-Nitroindazol (Reivich et al., 1997; Hirabayashi et al., 1999; Coert et al., 1999), ARL 17477 (Zhang et al., 1996) und BN 80933 (Chabrier et al., 1999) wirken durchweg neuroprotektiv in Form einer Infarktverkleinerung bei verschiedenen Modellen der fokalen zerebralen Ischämie. Obwohl viele Untersucher eine Reduktion des Infarktvolumens durch unterschiedliche nichtselektive NOS-Inhibitoren nachweisen konnten, gibt es auch gegensätzliche Befunde, die keine Reduktion oder sogar eine Vergrößerung des Infarktes zeigen (Nagafuji et al., 1998). Die Hemmung der NOS Isoform III führt zu einer Reduktion des rCBF in der Penumbra, was zu einer Vergrößerung des Infarktareals führte (Dalkara et al., 1994; Iadecola, 1997; Dawson, 1994).

Die Rolle der Funktion der verschiedenen Isoformen der NOS konnte durch Versuche an knock-out-Mäusen, denen das Gen und damit die entsprechende Isoform fehlte bestätigt

werden. So haben NOS Isoform I knock-out-Mäuse einen kleineren Infarkt als vergleichbare wild-type-Mäuse (Huang et al., 1994). Diese Reduktion der Infarktgröße konnte durch die Gabe nichtspezifischer NOS-Inhibitoren, deren Dosierung ausreichend war um die NO abhängige Relaxation der pialen Gefäße zu hemmen aufgehoben werden. Die genetische Deletion der NOS Isoform I verleiht bei einem Reperfusionsmodell mit transienter fokaler Ischämie dem Gewebe die größere Widerstandsfähigkeit gegen die ischämische Schädigung (Hara et al., 1996). Auch bei einem Modell der globalen zerebralen Ischämie wird der Schaden im Hippokampus reduziert (Panahian et al., 1996). Obwohl die NOS Isoform I konstitutiv exprimiert wird, kann die Bildung nach Infarkten von NOS Isoform I in einigen Zellen durch Proteinneusynthese induziert werden. So konnte nach einer MCA-Okklusion sowohl eine rasche Hochregulation der NOS Isoform I messanger-RNS (mRNA) wie auch des NOS-Proteins und der NADPH-diaphorase positiv gefärbten Zellen im ischämischen Gewebe beobachtet werden (Zhang et al., 1994). Es ist so durchaus möglich, daß der Anstieg der Expression der NOS Isoform I zur Ausweitung des neuronalen Schadens nach einem ischämischen Ereignis beiträgt.

1.4.2.2. NOS-Isoform II (iNOS)

In der Literatur wird das Enzym Isoform II auch als i-NOS (inducible NO synthase) oder mac-NOS (macrophages-NOS) bezeichnet.

Eine Vielzahl von Zellen und Geweben können induziert werden NO Synthase Isoform II zu exprimieren. Dabei hängt die Expression von Isoform II von der Einwirkung von Lipopolysacchariden und Cytokinen auf die Zellen ab.

Die Aktivität der NO Synthase Isoform II wird über die Transkription, induziert durch verschiedene Cytokine reguliert. Ist das Enzym erst einmal exprimiert, ist bis heute kein Regulationsmechanismus bekannt, der die Aktivität des Enzyms reguliert. Interessanterweise weist die Aminosäuresequenz der Isoform II eine Bindungsstelle für Calmodulin auf ungeachtet der Unabhängigkeit von freiem Calcium auf seine Aktivität (Xie et al., 1992).

Die NOS Isoform II kann nicht im gesunden Gewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich zu Makrophagen und Mikrogliazellen kann NOS Isoform II bei pathologischen Bedingungen in den meisten Geweben einschließlich Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert werden (Nathan und Xie, 1994). Die NOS Isoform II trägt wahrscheinlich erst in der Spätphase einer zerebralen Ischämie zum neuronalen Schaden bei. Die Induktion der NOS Isoform II in vitro führt zu einem verzögerten neuronalen Zelltod (Dawson et al., 1994; Loihl et al., 1999) und kann auch die glutamatvermittelte Neurotoxizität verschärfen (Hewett et al., 1994). Bei der Multiplen Sklerose spielt die NOS Isoform II eine Rolle in der Demyelisierung der Axone und auch zum neuronale Schaden bei Demenz im Rahmen

eines schweren AIDS-Syndroms trägt sie bei (Adamson et al., 1996). Im Hirn der Ratte läßt sich NOS Isoform II als Protein und als katalytische Aktivität 12 Stunden nach zerebraler Ischämie nachweisen. Seinen Höhepunkt erreicht es nach 48 Stunden und kehrt nach 7 Tagen wieder auf seinen Ursprungswert zurück (Iadecola et al., 1995). Der relativ selektive NOS Isoform II Inhibitor Aminoguanidin reduziert in der Spätphase nicht jedoch in der Frühphase der Ischämie das Infarktvolumen gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant um 21-30% und verbessert das neurologische Outcome am zweiten oder vierten Tag postischämisch, wenn er 24 Stunden nach Einsetzen der zerebralen Ischämie appliziert wird (Zhang und Iadecola, 1998; Nagayama et al., 1998). Auch der selektive Inhibitor 1400W (N-(3-(aminomethyl)-benzyl))-Acetamidin zeigt eine deutliche Reduktion der Infarktgröße um 31%, reduziert die Aktivität der NOS Isoform II um 36% und verbessert das neurologische Outcome bei der Ratte (Parmentier et al., 1999). Eine Verdeutlichung der Rolle, die NOS Isoform II in der Spätphase der zerebralen Ischämie spielt zeigt auch die Untersuchung, daß transgene Mäuse, denen das Gen für NOS Isoform II fehlt signifikant kleinere Infarkte entwickeln als die wild-type-Kontrollgruppe (Iadecola et al., 1996; Iadecola et al., 1997). Diese Verkleinerung der Infarkte zeigt sich erst in der Spätphase der Ischämie (96h nach Infarkt) und stimmt mit dem zeitlichen Auftreten der mRNA und des Proteins der NOS Isoform II überein (Iadecola et al., 1997). Auch scheint das Geschlecht des Versuchstieres eine Rolle zu spielen, da männliche Mäuse größere Infarkte entwickeln als weibliche Mäuse oder NOS Isoform II Nullmäuse (Loihl et al., 1999). Auch das Alter der Versuchstiere scheint eine Rolle zu spielen wie Nagayama et al. in ihren Untersuchungen zeigen. So entwickeln NOS Isoform II Nullmäuse nur im Alter von 1 bis 2 Monaten kleinere Infarkte. Sowohl vorher wie nachher sind die Infarkte im Vergleich zur Kontrollgruppe größer (Nagayama et al., 1999). Diese Beobachtungen decken sich mit den Untersuchungen von Ashwal et al. (Ashwal et al., 1999). Inwieweit die Hochregulation der NOS Isoform II in Endothelzellen einen protektiven Effekt nach einer zerebralen Ischämie durch eine mögliche Steigerung des rCBF hat ist unklar und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

1.4.2.3. NOS-Isoform III (eNOS)

In der Literatur wird das Enzym Isoform III auch als EC-NO-Synthase oder eNOS (endothelial NO-synthase) oder c-NO-Synthase (constitutive NO-synthase) bezeichnet. Diese Bezeichnung ist irreführend, da hierdurch keine Unterscheidung zu der Isoform I getroffen wird.

Die Isoform III scheint relativ spezifisch für Endothelzellen zu sein. Sie wurde in arteriellen und venösen Endothelzellen in unterschiedlichen Geweben und bei unterschiedlichen Spezies einschließlich des Menschen gefunden (Pollock et al., 1993). Zusätzlich wurde

Isoform III auch in Zellen des Synzytiotrophoblasten der menschlichen Plazenta (Myatt et al., 1993) und in LLC-PK1-Epithelzellen im Tubulus der Niere (Tracey et al., 1994) entdeckt.

Die Isoform III ist konstitutiv in Endothelzellen aktiv. Ihre Aktivität wird, ähnlich der Isoform I, durch die Konzentration des freien Calciums (Konzentration zwischen 100 und 500nmol/L) und Calmodulin reguliert (Förstermann et al., 1991). Zusätzlich scheint es Mechanismen zu geben, die die Aktivität der Isoform III über die Rate der Expression des Gens regulieren. So erhöht nicht nur der Scherstreß des fließenden Blutes die NO Produktion der Isoform III (Lamontagne et al., 1992), sondern auch die Expression des Enzyms wird hochgeregelt (Nishida et al., 1992). Marsden et al. beschreiben eine Region in der Promotersequenz der NO Synthase III die vermutlich auf Scherstreß reagiert (Marsden et al., 1993).

NO gilt als der Hauptregulator der vaskulären Hämodynamik und ist der Hauptmessenger, der die Dilatation der Blutgefäße bewirkt (Huang PL et al., 1995). Selbst eine nur teilweise Hemmung der NOS Isoform III verursacht große Veränderungen im zerebralen Blutfluß.

In früheren Untersuchungen über das Ausmaß des ischämischen Schadens nach Hemmung der NOS benutzten die Untersucher unselektive NOS-Inhibitoren und daher basierten ihre Aussagen und Vermutungen über die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie auf der Verwendung dieser unselektiven NOS-Inhibitoren. So ließ sich keine Differenzierung zwischen den einzelnen Isoformen vornehmen und daher sind die Befunde oft verwirrend (Dalkara et Moskowitz, 1994; Iadecola, 1997; Dawson, 1994). Diese unselektiven NOS-Inhibitoren hemmen sowohl die NOS Isoform I wie auch NOS Isoform III. Die Gabe von unselektiven NOS-Inhibitoren bewirkt eine Konstriktion der pialen Gefäße, reduziert den rCBF und führt damit letztlich zur Vergrößerung des Infarktvolumens. Im Gegensatz dazu führt die Gabe von NO-Donatoren oder die intraarterielle Gabe von L-Arginin bei der Ratte zu einer Verbesserung des rCBF und führt hierüber zu einer Verkleinerung des Infarktareals distal der MCA-Okklusion (Dalkara et Moskowitz, 1994; Iadecola, 1997; Dawson, 1994). Transgene Mäuse, denen NOS Isoform III fehlt haben nach MCA-Okklusion größere Infarktvolumina als die wild-type-Kontrolltiere (Huang Z et al., 1996). Des weiteren bewirkt der nicht spezifische NOS-Inhibitor Nitro-L-Arginin eine Verkleinerung der Infarktvolumina von NOS Isoform III-Nullmäusen, hat jedoch keinen Einfluß auf das Infarktvolumen bei wild-type Kontrolltieren. Dabei wirkt Nitro-L-Arginin bei NOS Isoform III Nullmäusen auf die neurotoxische NOS Isoform I in der frühen Phase der Ischämie.

Diese Untersuchungen erhellen die zweischneidige Wirkung der NO bei der fokalen zerebralen Ischämie. So führt eine Überproduktion von NO durch die Aktivierung der NOS Isoform I zu einer neurotoxischen Wirkung, wohingegen die Produktion von NO durch die

NOS Isoform III eine protektive Wirkung auf das Hirngewebe hervorgerufen durch eine Steigerung des rCBF hat. Durch die Entwicklung von selektiven NOS Inhibitoren und transgenen Mäusen konnte die divergierende Rolle von NO klarer gemacht werden. Interessanterweise wird auch das NOS Isoform III Protein und seine katalytische Aktivität wie bei der NOS Isoform I, in der Akutphase der Ischämie hochreguliert (Zhang ZG et al., 1993). Möglicherweise fördert die Hochregulation der NOS Isoform III die Protektion der neuronalen Zellen durch derzeit noch unbekannte Mechanismen, die helfen den rCBF dauerhaft aufrecht zu erhalten.

1.5. Kohlendioxid (CO_2) in der Regulation des zerebralen Blutflusses (rCBF)

Wie oben ausgeführt, spielt CO_2 im Rahmen der lokal-chemischen Faktoren bei der Regulation des zerebralen Blutflusses eine wichtige Rolle. Eine Vielzahl von Studien zeigt, daß eine Änderung des pCO_2 um je 1 mmHg eine Änderung des globalen CBF von 1-2 ml/100g/min nach sich zieht (Alberti et al., 1975; Sato et al., 1984). Ein reduzierter pCO_2 von 20-25 mmHg reduziert den globalen CBF um 40-50% und eine weitere Verringerung des pCO_2 führt zu keiner weiteren Verringerung des CBF mehr (Reivich, 1964; Alexander et al., 1968). Eine Steigerung des pCO_2 auf $\geq$ 80 mmHg verursacht bei anästhesierten Versuchstieren einen maximalen Anstieg des CBF auf 100-200% (Reivich, 1964; Iadecola et Zhang, 1994). In wachen Versuchstieren verursacht der gleich hohe Anstieg des pCO_2 eine Steigerung des CBF um das Sechsfache, wobei wahrscheinlich jedoch die Hälfte dieses Anstieges auf die Ausschüttung von endogenen Katecholaminen und der Aktivierung des neuronalen Metabolismus zurückzuführen ist (Berntman et al., 1979). Diese Untersuchung von Berntman et al. bei wachen Versuchstieren legt den Schluß nahe, daß eine schwere Hyperkapnie den CBF auf zwei Arten ansteigen läßt. Erstens, durch einen direkten Mechanismus in Form der Wirkung des Kohlendioxids (CO_2) auf die zerebralen Gefäße und zweitens auf indirekte Art und Weise durch eine Steigerung des zerebralen Metabolismus.

Golding et al. berichten, daß exogenes L-Arginin die CO_2-Reaktivität im einem Cortical-impact-modell bei der Ratte nach zwei Stunden teilweise wiederherstellt. Der NO-Donor SNAP (S-nitroso-*N*-acetylpenicillamin) und der Freie-Radikal-Fänger Polyethylen-glykol-superoxiddismutase und –katalase alleine führten zu keiner Besserung der CO_2-Reaktivität. Aus diesem Grund schlossen die Autoren, daß der positive Effekt von L-Arginin auf einer kombinierten Wirkung durch die Bereitstellung von Substrat für die NO-Synthase und dem Abfangen von freien Radikalen beruhen müsse (Golding et al. 2000).

1.6. Fragestellungen

Die Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von M. Moskowitz stellen die exogene Zufuhr von L-Arginin als mögliche Schlaganfalltherapie mit Verbesserung der Durchblutung in der Penumbra, dar. Da L-Argininfusionen auch beim Menschen wenig Nebenwirkungen haben wäre dies eine klinisch nutzbare Therapie. In Anbetracht der geringen Wirkung anderer Vasodilatatoren auf penumbrale Gefäße, und der möglichen Stimulation neurotoxischer Vorgänge über die NOS Isoform I und NOS Isoform II, sollten vor einer klinischen Prüfung von L-Arginin die folgenden Fragen tierexperimentell am Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie untersucht werden.

1.) Können die Ergebnisse von Dalkara et al. bei einer transitorischen fokalen zerebralen Ischämie bestätigt werden, daß die exogene Zufuhr von L-Arginin einen CBF-Anstieg in der ischämischen Penumbra während der Reperfusionsphase erzeugt?

2.) Spielt hierbei die Ischämiedauer eine Rolle und wenn ja welche?

3.) Unterscheidet sich die Reaktivität auf exogenes L-Arginin von der CBF-Antwort eines anderen Vasodilatators z.B. CO_2?

4.) Beeinträchtigt NO selbst, als potentiell neuro- und vasotoxisches Radikal, die penumbrale Vasoreaktivität?

2. Material und Methoden

2.1. Charakterisierung des Tiermodells

2.1.1. Präparationsbeschreibung

Die Untersuchungen wurden an erwachsenen, männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 260g bis 300g (Charles River Deutschland; Sulzfeld) durchgeführt. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 mg/kg Thiopentalbarbiturat (Trapanal®, Byk Gulden, Konstanz) anästhesiert. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden im Versuchsverlauf regelmäßig mechanische Schmerzreize gesetzt. Bei Abwehrreaktionen und Blutdruckschwankungen wurden zusätzliche Dosen (20 mg/kg i.p.) von Trapanal® appliziert. Ferner wurde vor jeder Hautinzisur eine 1%-ige Lidocainlösung in das entsprechende subkutane Gewebe injiziert.

Nach erfolgter Anästhesie wurden die Ratten tracheotomiert. Anschließend wurde ein Tubus (Polyethylen-Schlauch PE 250) in die Luftröhre eingeführt. Fortan wurden die Tiere mechanisch mit Raumluft unter Zugabe von Sauerstoff beatmet (Harvard small animal ventilator, Modell 683, South Natick, MA). Zur kontinuierlichen Überwachung der künstlichen Ventilation wurde ein Infrarot-CO_2-Meßgerät (Heyer, Modell 2200, Bad Ems) eingesetzt, daß den Kohlendioxidgehalt in der ausgeatmeten Luft fortlaufend registriert. Dieser endexspiratorische P_aCO_2 wurde während des gesamten Versuchs -falls notwendig - durch Veränderung der Atemfrequenz und -seltener- des Atemvolumens im Bereich von 30-35 mm Hg gehalten.

Nach Beginn der kontrollierten Beatmung wurden die linke Arteria und Vena femoralis mit Polyethylen-Schläuchen (PE 50) kanüliert. Über den A. femoralis-Katheter wurden zum einen der systemische arterielle Blutdruck (SAP) mit einem Statham P23 Druckwandler aufgezeichnet, zum anderen Blutproben zur Blutgasanalyse abgenommen (Bestimmung von P_aO_2, P_aCO_2 und pH mit dem Blutgasanalysator IL 1304; Instrumentations Laboratories, Kirchheim). Über den V. femoralis-Katheter wurde zur Flüssigkeitssubstitution 0,9%-ige Kochsalzlösung mit einer Präzisionsinfusionspumpe infundiert (1ml/h; Precidor, Typ 5003, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Außerdem konnte der venöse Zugang zur Applikation von Medikamenten (siehe hierzu Versuchsprotokolle) verwendet werden.

Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mit Hilfe eines regulierbaren Heizkissens in einem Bereich von 37.5 °C gehalten.

Die transitorische fokale zerebrale Ischämie wurde durch eine von uns leicht modifizierte Methode der intraluminalen Gefäßokkulsion nach Longa et. al. 1989 erzeugt. Der wesentliche Unterschied zu der Methode nach Longa et al. 1989 besteht in der Kanülierung der linken A. carotis communis mittels eines Polyethylenschlauches (PE 50), der als Führungskatheter für den monofilären 3-0 Nylonfaden dient.

Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Vergrößerung 3-20-fach) wurde der linke laterale Halssitus über die mediane Inzisur, die für die Tracheotomie geschaffen wurde dargestellt. Das Platysmaäquivalent, Muskulus sternocleidomastoideus und die Vena jugularis externa wurden nach lateral gedrängt und mit einem selbstnachstellenden Retraktor gehalten. Der Muskulus omohyoideus wurde in Richtung der Arteria carotis communis durchtrennt.

Nun wurden die Arteria carotis communis, die Arteria carotis externa und die Arteria carotis interna dargestellt und unter Schonung der abgehenden Gefäße mobilisiert. Der Nervus vagus und die Vena jugularis interna wurden, um Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen zu vermeiden, unter äußerster Schonung von der Arteria carotis communis und der Arteria carotis interna abpräpariert und die Vena jugularis interna nach lateral und der Nervus vagus nach medial verlagert. Die Arteria carotis interna wurde bis zum Foramen jugulare dargestellt.

Über die Arteria carotis communis wurde mit einem Polyethylenschlauch (PE 50) die Arteria carotis interna kanüliert. In diesem Polyethylenschlauch befand sich ein chirugischer monofilärer 3-0 Nylonfaden, dessen Ende durch Hitze abgerundet und mit Sekundenkleber minimal verdickt war. Der 3-0 Nylonfaden wurde nun unter Sicht durchschnittlich 11mm von der Bifurkation der Arteria communis vorgeschoben, sodaß sich der Kopf des Fadens im Foramen jugulare befand und somit die Blutversorgung des Gehirnes über den Circulus arteriolosus Willisi sichergestellt war.

Der Sinn der Modifikation bestand darin, die Ischämie in Bauch- oder Rückenlage der Ratte induzieren zu können, da der CBF über die gesamte Versuchsdauer gemessen werden sollte. Mit dieser Modifikation war es möglich, die Ratte auf den Bauch in einem stereotaktischen Rahmen zu lagern, da nur so ein stabiles Plazieren der Laser-Doppler-Fluß-Sonden (LDF) auf der Schädelkalottenoberfläche möglich war.

Der „Katheter“ wurde nun am Bauchfell der Ratte fixiert, um einen spannungsfreien Verlauf zu gewährleisten und die Wunde wurde mit einer Hautnaht verschlossen.

Die Ratte wurde nun auf den Bauch gedreht und der Kopf in einem stereotaktischen (Kopfhalte)-Rahmen fixiert.

Über einen sagittalen Hautschnitt wurde die Schädelkalotte dargestellt und nach zusätzlicher Lokalanästhesie mit 0,9% Lidocain das Periost wegpräpariert. Um den regionalen zerebralen Blutfluß messen zu können, wurde unter ständiger Kühlung mittels physiologischer Kochsalzlösung das rechte und linke Os parietale so weit ausgedünnt, bis die pialen Hirngefäße makroskopisch sichtbar waren. Dies hatte zwei Gründe. Erstens mußte die Schädelkalotte soweit ausgedünnt werden um transparent für das Laserlicht für die LDF-Messung zu sein, zweitens sollten die Sonden nicht über einem makroskopisch sichtbaren Gefäß plaziert werden um Fehlmessungen zu vermeiden.

Die beiden Sonden des Zweikanal-Laser-Doppler-Flowmeter (Modell Perimed, Periflux 4001 Master, Järfälla, Schweden) wurden auf einem Areal der beiden Hemisphären plaziert, die frei von makroskopisch sichtbaren pialen Gefäßen waren. Da in der Penumbra gemessen werden sollte, lag das Meßareal auf beiden Hemisphären 5 bis 6 mm lateral der Mittellinie und 1 bis 2 mm caudal des Bregmas.

Der regionale zerebrale Blutfluß wurde mit der Laser-Doppler-Blutfluß (LDF)-Methode bestimmt.

Der systemische arterielle Blutdruck, der endexspiratorische Kohlendioxidgehalt und der regionale zerebrale Blutfluß wurden kontinuierlich während der gesamten Dauer eines Experiments über ein PC-System mit dem Prozeßdatenerfassungssystem Perisoft (Perimed-Programm, Perimed, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet.

Abbildung 1: Versuchsaufbau

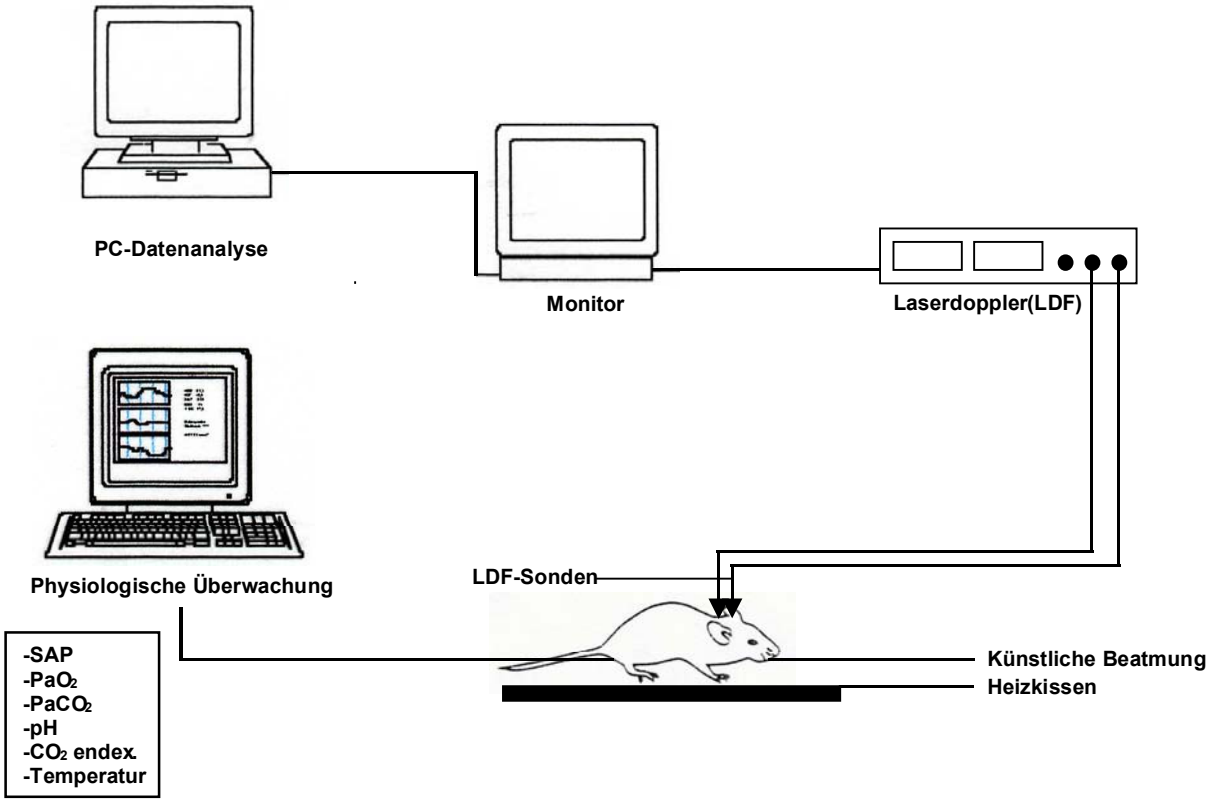


Abbildung 1: Versuchsaufbau

Anästhesierte Ratten wurden tracheotomiert und anschließend künstlich beatmet. Über dem rechten und linkem parietalen Kortex, 1mm kaudal und 2-3 mm lateral des Bregmas, wurde je eine der Laser-Doppler-Blutfluß (LDF)-Sonden mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens plaziert. Am Versuchsanfang und –ende wurde die CO2-Reaktivität mittels Hyperkapnie getestet. Während der gesamten Versuchdauer wurden kontinuierlich der regionale zerebrale Blutfluß (rCBF) auf beiden Hemisphären, der mittlere arterielle Blutdruck (SAP) und der endexspiratorische

Kohlendioxidgehalt (CO_2 endex.) gemessen. In regelmäßigen Abständen wurden arterielle Blutproben zur Blutgasanalyse, zur pH- und Hämatokrit-Bestimmung gewonnen.

Abbildung 2: Lage der LDF-Meßsonden:

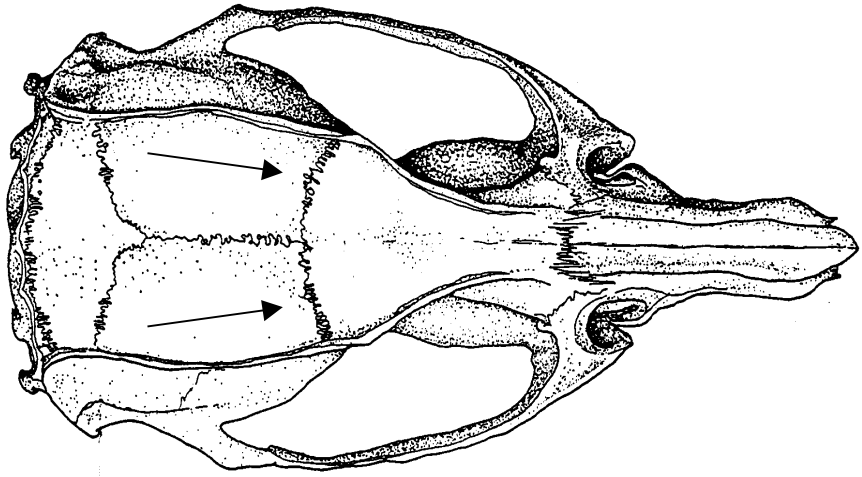


Abbildung 2: Lage der Meßsonden

Die Abbildung zeigt den knöchernen Schädel der Ratte von cranial. Die Pfeile bezeichnen die Punkte, wo die Sonden des Laser-Dopplers-Gerätes aufgesetzt wurden. Die Position der Sonden ist auf jeder Hemispäre 1mm caudal und 3-4mm lateral des Bregmas.

Abbildung 3: Modifiziertes Fadenmodell bei der Ratte:

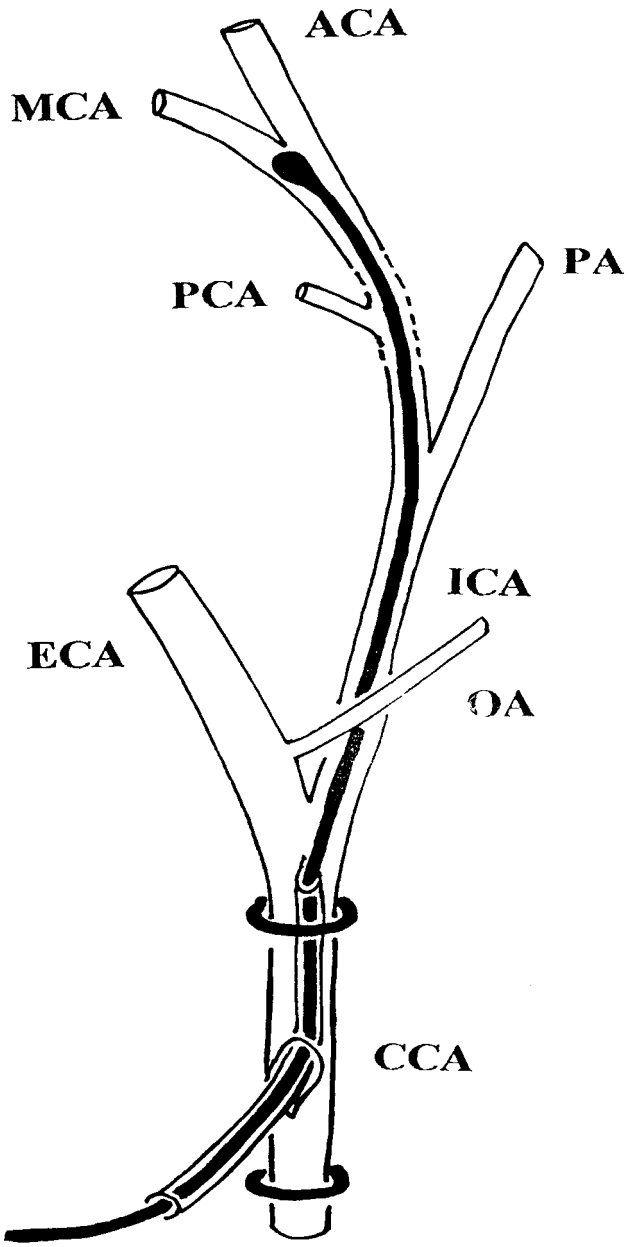


Abbildung 3:

Die Abbildung zeigt die von uns mit einem PE-Schlauch modifizierte Methode der MCA-Okklusion. Die Modifikation bietet die Möglichkeit, den Faden trotz Bauchlage der Ratte vorzuschieben und anschließend wieder zurückzuziehen. Dies war notwendig um eine kontinuierliche LDF-Messung mit den beidseits temporal plazierten LDF-Sonden durchführen zu können.

CCA Arteria carotis communis; ECA Arteria carotis externa; ICA Arteria carotis interna; OA Arteria opthalmica; PA Arteria pytergopalatina; PCA Arteria cerebri posterior; MCA Arteria cerebri media; ACA Arteria cerebri anterior;

2.1.2. Meßeinrichtungen und Meßverfahren

2.1.2.1. Vitalparameter

Die Überwachung der Beatmungsparameter erfolgte über die Entnahme von arteriellen Blutproben aus dem Katheter der Arteria femoralis und deren Analyse von Sauerstoffpartialdruck (pO2), Wasserstoffionenkonzentration (pH), Kohlendioxidpartialdruck (pCO2) und des Base-exess (BE) mit einem Blutgasanalysator der Marke Instrumentation Laberatory IL 1306.

Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde kontinuierlich gemessen und durch ein Heizkissen auf 37,0 Grad Celsius gehalten.

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

2.1.2.2. Messung der CO_2-Reaktivität zerebraler Gefäße

Am Versuchsanfang und -ende wurde bei allen Versuchsgruppen die CO_2-Reaktivität zerebraler Gefäße bestimmt. Unter physiologischen Bedingungen erweitern sich zerebrale Gefäße bei einem Anstieg des arteriellen P_aCO_2 (Hyperkapnie), die Hirndurchblutung steigt. Eine intakte CO_2-Reaktivität zerebraler Gefäße gilt als Parameter für die funktionelle Integrität zerebraler Gefäße.

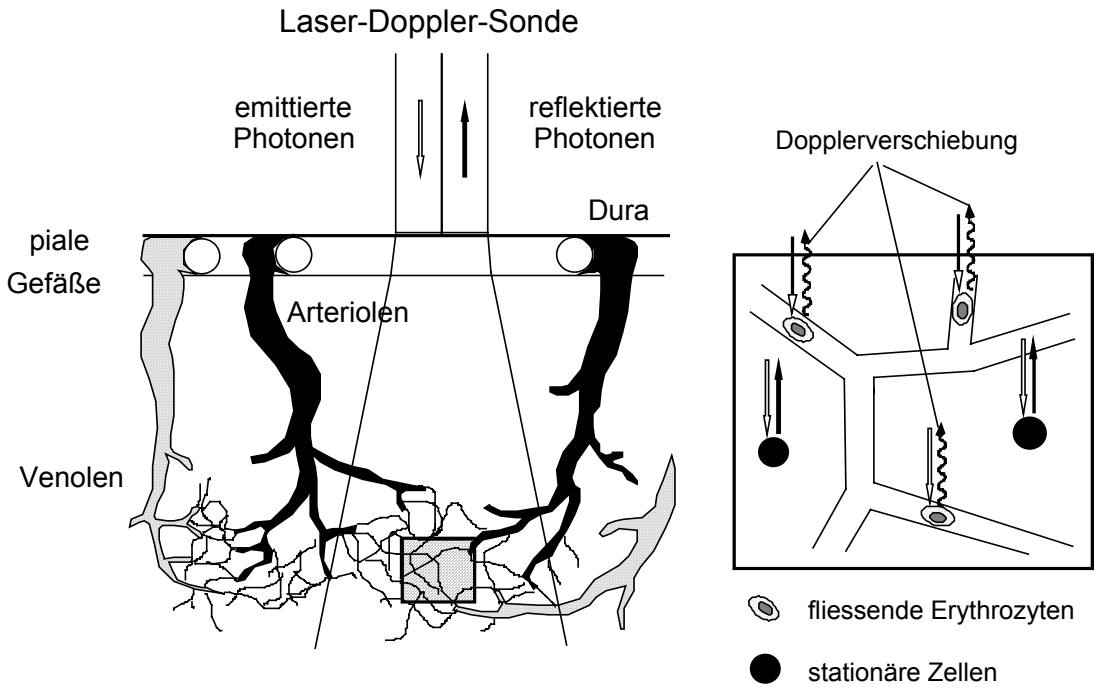
Zur Überprüfung wurden die Tiere mit einem Gasgemisch folgender Zusammensetzung beatmet: 10% CO_2, 21% O_2 , 69% N_2. Zu Beginn und am Ende der Hyperkapnie (Dauer: 7min) wurden arterielle Blutproben gewonnen und die Blutgase und der pH gemessen. Dabei wurde der regionale zerebrale Blutfluß während des Tests kontinuierlich registriert. Die CO_2-Reaktivität zerebraler Gefäße wurde als physiologisch bewertet, wenn der regionale zerebrale Blutfluß bei Versuchsbeginn um mehr als 2% pro mm Hg P_aCO_2 - Erhöhung anstieg (Jones et al., 1989).

Lag die CO_2-Reaktivität zu Beginn des Versuches unterhalb dieses Wertes führte dies zum Ausschluß des Versuchtieres.

2.1.2.3. Die Laser-Doppler-Blutflußmethode

Mit der LDF-Methode wird der Blutfluß der kapillären Mikrozirkulation nicht-invasiv gemessen. Dafür sendet der Kopf eines flexiblen faseroptischen Kabels Licht eines 5 mW Dioden-Lasers mit einer nominalen Wellenlänge von 780 nm (des Absorbtionsspektrum des Hämoglobins) ins Gewebe und beleuchtet in einem Meßvolumen von ungefähr 1 mm³ bewegte und stationäre Zellen (siehe Abbildung 5). Die eingestrahlten Photonen werden von beiden "Zelltypen" d.h. den bewegten und den stationären Zellen, in Zufälligkeitsverteilung gestreut. Dabei erfahren die von fließenden Blutzellen (vornehmlich Erythrozyten) gestreuten Photonen eine Frequenzveränderung, nämlich die sogenannte Dopplerverschiebung (siehe Abbildung 5).
Photonen, die auf stationäre Gewebszellen treffen, werden dagegen mit gleicher Wellenlänge reflektiert. Ein Teil des (zurück-) reflektierten Lichts gelangt in zwei optische Fasern im Kopf des Lichtleiterkabels und wird in der Faseroptik zu einem Photodetektor weitergeleitet, der das Strahlungs-Wellengemisch in ein elektrisches Signal umwandelt.
In diesem Signal sind Informationen über Frequenzen und elektrische Spannungen enthalten. Die dem Blutvolumen zuzuschreibenden Anteile aus dem Signalgemisch werden aus der Relation einer Wechselstromkomponente AC zur Gleichstromkomponente DC ermittelt. AC ist der Effektivwert aller Wechselstromkomponenten. DC ist der Mittelwert der Signalspannungen, die durch alle auf den Photodetektor treffenden, frequenzverschobenen und -festen Photonen innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls generiert werden. Ferner wird in jedem Zeitintervall eine mittlere Frequenzveränderung bestimmt, die der räumlich gemittelten Fließgeschwindigkeit aller Blutzellen im Meßvolumen proportional ist. Das Produkt aus Blutvolumen-assoziiertem und Blutflußgeschwindigkeit-assoziiertem und kalkuliertem Anteil ergibt einen Wert, der zum Blutfluß der Mikrozirkulation direkt proportional ist (Dirnagl et al. 1990).

Abbildung 4: Prinzip der Laser-Doppler-Blutflußmessung



Die LDF-Methode liefert keine absoluten Blutflußwerte (in ml/100g/min), gestattet aber die Angabe relativer Blutflußveränderungen als Prozentveränderungen vom Ausgangswert (Smits et al., 1986). In den vergangenen Jahren wurde die LDF-Methode an den verschiedensten Organen (z.B. Haut und Zentralnervensystem) mit Standardblutflußmethoden validiert. Im Zentralnervensytem wurde die Laser-Doppler-Blutflußmessung mit etablierten Methoden, wie der Hydrogen-Clearance-Methode, der ^{14}C-Iodoantipyrin-Autoradiographie, der Videometrie oder der Mikrosphärentechnik, verglichen (Dirnagl et al., 1989; Haberl et al., 1989a; Haberl et al., 1989b). Alle Studien zeigten eine exzellente Übereinstimmung der LDF-Methode mit der jeweiligen Referenztechnik bei der Messung prozentualer Blutflußveränderungen, jedoch nicht bei der Bestimmung absoluter Blutflußwerte.

Der Vorteil der Laser-Doppler Methode liegt in der hohen zeitlichen Auflösung. Nachteil der Methode ist, daß keine Absolutwerte der Durchblutung gemessen werden können und daß sich auch keine Aussage über die regionale Verteilung des Blutflusses machen läßt.

Da bei den von uns geplanten Untersuchungen die Beobachtung zerebraler Blutflußveränderungen im Verlauf einer fokalen zerebralen Ischämie, d.h. kontinuierlich über mehrere Stunden, beabsichtigt war, hielten wir die LDF-Methode für die Methode der Wahl, zumal sie nicht-destruktiv ist und über einen großen Blutfluß-Bereich validiert ist

(von 10 - ~300% des normalen Ausgangswertes) (Kvietys et al., 1985) (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. U. Ködel).

2.1.3. Eingesetzte Substanzen

Für die Anästhesie verwendeten wir Thiopentalbarbiturat intraperitoneal (100mg/kg KG) (Trapanal, Byk Gulden, Kontanz) gelöst in 0.9% NaCl-Lösung. Bei nicht ausreichender Narkosetiefe wurde eine Einmalgabe von 20mg/kg KG Thiopentalbarbiturat i.p. nachgegeben.

L-Arginin (300mg/kg KG), D-Arginin (300mg/kg KG) und N-$^{\omega}$-nitro-L-Arginin (10mg/kg KG) (alle von Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) wurden in 0.9% NaCl-Lösung gelöst und intravenös verabreicht.

2.2. Versuchsprotokolle

Die nachfolgenden Versuchsreihen wurden durchgeführt:

Gruppe 1: Kontrollgruppe sham-operiert (n= 5) und L-Arginin-Gabe (300 mg/kg KG in 5 min intravenös)

Gruppe 2: 5 min Ischämie, 90 min Reperfusion und L-Arginin-Gabe (300 mg/kg KG in 5 min intravenös) 45 min nach Reperfusionsbeginn (n= 6)

Gruppe 3: 20 min Ischämie, 90 min Reperfusion und L-Arginin-Gabe (300 mg/kg KG in5 min intravenös) 45 min nach Reperfusionsbeginn (n= 7)

Gruppe 4: 20 min Ischämie, 90 min Reperfusion und D-Arginin-Gabe (300 mg/kg KG in 5 min intravenös) 45 min nach Reperfusionsbeginn (n= 6)

Gruppe 5: Vorbehandlung mit L-Nitro-Arginin (10mg/kg KG) 20 min vor Ischämie, 20 min Ischämie, 90 min Reperfusion und L-Arginin-Gabe (300 mg/kg KG in 5 min intravenös) 45 min nach Reperfusionsbeginn (n= 6)

2.3. Versuchsdurchführung

Nach Abschluß der Präparation wurde ein halbstündiges Meßintervall zur Kontrolle der Konstanz des zerebralen Blutflusses und der physiologischen Parameter durchgeführt,
Dieses Meßintervall diente als base-line, d.h. diese Größe wurde als 100% definiert und alle anderen in Prozentwerten davon angegeben. Es schloß sich eine Hyperkapnie (Dauer 7.5 min) an, um die Reaktivität der Hirndurchblutung zu testen.
Sobald sich der Blutfluß wieder auf seine Ausgangswerte eingependelt hatte und für 10 min stabil war, wurde der Faden bis zum Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben und diese damit verschlossen was eine Ischämie im Mediastromgebiet erzeugte.
Eine Ausnahme bildete die Versuchsgruppe 5, die nach der Hyperkapnie und nachdem sich die Blutflußwerte wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt hatten, mit L-NA (10 mg/kg KG in 5 min intravenös) vorbehandelt wurde. Die L-NA-Gabe erfolgte 20min vor Ischämiebeginn, da aus pharmakologischen Gründen L-NA seine Wirkung erst ab diesem Zeitpunkt entfaltet. Da L-NA blutdrucksteigernd wirkt und die Grenzen der zerebralen Autoregulation nicht überschritten werden sollten, führten wir, um den durch L-NA verursachten Blutdruckanstieg zu begrenzen, eine hämorrhagische Blutdruckreduktion durch. Dabei wurde venöses Blut über den Vena-femoralis-Katheter sukzessive abgelassen und bei 37 Grad Celsius, unter Zugabe von einigen Tropfen Heparin asserviert (Dirnagl and Pulsinelli, 1990). Um den Blutdruck konstant zu halten d.h. im Bereich der zerebralen Autoregulation, wurde dieses Blut im Laufe des Versuches, wenn dies wegen Blutdruckfall nötig war, sukzessive wieder reinfundiert.
Nach 5 min (Versuchsgruppe 2) respektive 20 min (Versuchsgruppe 3,4 und 5) Ischämiedauer wurde der Faden zurückgezogen und damit eine 90 minütige Reperfusion eingeleitet. 45 Minuten nach Reperfusionbeginn wurde L-Arginin (300 mg/kg KG in 5 min)(Versuchsgruppe 1,2,3 und 5) oder D-Arginin (300 mg/kg KG in 5 min) (Versuchsgruppe 4) intravenös infundiert. Die CBF-Werte ipsilateral der kanülierten Arteria carotis und kontralateral davon (Kontrollhemisphäre) wurden 30min nach der Argininfusion gemessen. Abschließend wurde eine zweite Hyperkapnie (Dauer 7.5 min) durchgeführt, um die Reaktivität der zerebralen Hirndurchblutung in der Reperfusion nach Ischämie zu testen.

2.4. Statistische Methoden

Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

Der lokale Blutfluß wird als Prozentwert der Veränderung vom Ausgangswert (= 100%) zum Zeitpunkt der baseline am Anfang jedes Versuches angegeben.

Die p-Werte wurden nach der Bonferroni-Holm-Prozedur entsprechend der Anzahl der statistisch berücksichtigten Meßzeitpunkte korrigiert ($p = \alpha/n$; wobei $\alpha = 0.05$ und n = Anzahl der Meßzeitpunkte). Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant gewertet.

Als statistischer Test wurde eine Varianzanalyse (One-Way Analysis of Variance) durchgeführt.

Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu analysieren, wurden die Versuchsgruppen dem Students-Newman-Keul-Test unterzogen.

Um signifikante rCBF-Veränderungen über die Zeit (= Beobachtungsintervall) innerhalb einer Gruppe aufzuzeigen, wurden die Daten einem gepaarten t-Test unterzogen.

Um Differenzen des lokalen Blutflußes zwischen den beiden Hemisphären innerhalb einer Gruppe darzustellen wurde ein ungepaarter t-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Parameter

Während den gesamten Versuchsreihen wurde kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Körperkerntemperatur (T) kontrolliert und aufgezeichnet. In Intervallen wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO_2), der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2), die Wasserstoffionenkonzentration (pH) und der Hämatokrit (Hkt) kontrolliert und aufgezeichnet.

Die MAP in den einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 1 gezeigt. Trotz der Volumenentnahme lagen in Gruppe 5 (L-NA-Vorbehandlung) die MAPs signifikant höher, jedoch innerhalb der Grenzen der zerebralen Autoregulation bei der Ratte. Die anderen physiologischen Parameter lagen im Bereich der physiologischen Norm (Werte nicht gezeigt).

Tabelle 1:

Mittlerer arterieller Blutdruck in den verschiedenen Versuchsgruppen

	Praeischämie	Ischämie	Reperfusion
Versuchsgruppe	**MAP (mmHg)**	**MAP (mmHg)**	**MAP (mmHg)**
1	108 +/- 3.4	106 +/- 4.0	103 +/- 7.1
2	103 +/-13.7	104 +/- 8.8	101 +/- 11.6
3	102 +/-14.4	103 +/- 13.9	104 +/- 14.9
4	103 +/- 6.0	100 +/- 7.2	102 +/- 9.4
5	119 +/- 6.4*	119 +/- 9.3ψ	122 +/- 10.2ψ

Tabelle 1:

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in den einzelnen Versuchsgruppen:

Versuchsgruppe 1: Kontrollgruppe der Sham-operierten Versuchstiere (n= 5).

Versuchsgruppe 2: Gruppe der 5-minütigen Ischämie und L-Argininfusion (300mg/kg KG i.v./5min.) 45 min. nach Reperfusion (n= 6).

Versuchsgruppe 3: Gruppe der 20-minütigen Ischämie und L-Argininfusion (300mg/kg KG i.v./5min.) 45 min. nach Reperfusion (n= 7).

Versuchsgruppe 4: Gruppe der 20-minütigen Ischämie und D-Argininfusion (300mg/kg KG i.v./5min) 45 min. nach Reperfusion (n= 6).

Versuchsgruppe 5: 20min. Ischämie und Vorbehandlung mit N-nitro-L-Arginin (10mg/kg KG i.v./5min.) 20min. vor Ischämiebeginn und L-Argininfusion (300mg/kg KG i.v./5min.) 45min. nach Reperfusion (n= 6).

$*$ $P < 0.05$ im Vergleich der Gruppen 1, 3 und 4.

$\psi P < 0.05$ im Vergleich der Gruppen 1, 2, 3 und 4.

(Varianzanalyse (one way analysis of varianz) und Student-Newman-Keuls-Test).

MAP mittlerer arterieller Blutdruck. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standartabweichung.

3.2. Der Einfluß von L-Arginin auf den rCBF in der Reperfusion bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie mit einer 5- und 20-minütigen Ischämie

L-Arginin erhöhte den rCBF signifikant bei sham-operierten Tieren (Gruppe 1) und in der Reperfusionsphase nach einer 5-minütigen Ischämie (Gruppe 2; Abbildung 5).

Die Blutflußantwort auf beiden Hemisphären war nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 5 a und b).

Nach 20-minütiger Ischämie war die rCBF-Antwort auf die L-Argininingabe in der penumbralen Hirnregion signifikant reduziert (Versuchsgruppe 3; Abbildung 5a). Die Reaktion auf der kontralateralen Seite (nichtischämischen Hemisphäre) war erhalten (Versuchsgruppe 3; Abbildung 5b).

Das stereoisomerische Dimer D-Arginin hatte keinen Effekt auf den rCBF, weder in der ischämischen noch in der Kontrollhemisphäre (Versuchsgruppe 4; Abbildung 5 a und b).

Nach der Vorbehandlung mit L-NA und 20-minütiger Ischämie (Versuchsgruppe 5) verursachte L-Arginin einen rCBF-Anstieg in der Penumbra (Versuchsgruppe 5; Abbildung 5a). In der nichtischämischen Hemisphäre verstärkte die L-NA-Vorbehandlung die Steigerung des rCBF auf die Gabe von L-Arginin drastisch (Versuchsgruppe 5; Abbildung 2b). Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Änderung des rCBF zwischen der ischämischen und der nichtischämischen Hemisphäre (Versuchsgruppe 5; Abbildung 5a und b).

Abb. 5a: Ischämische Hemisphäre

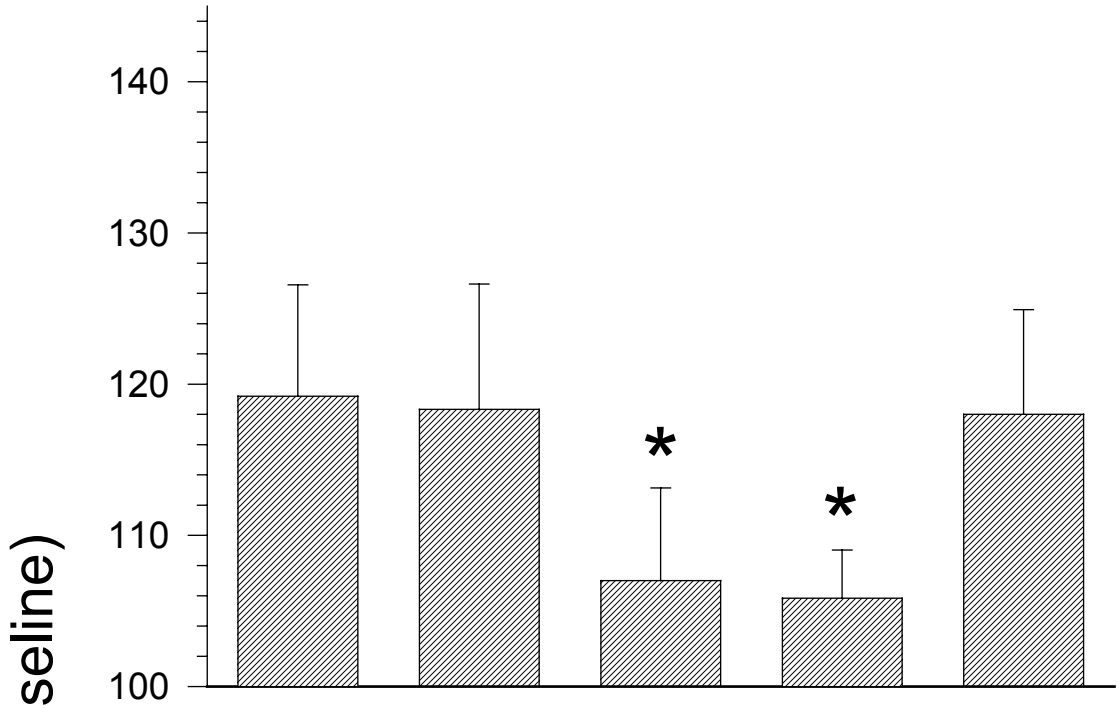
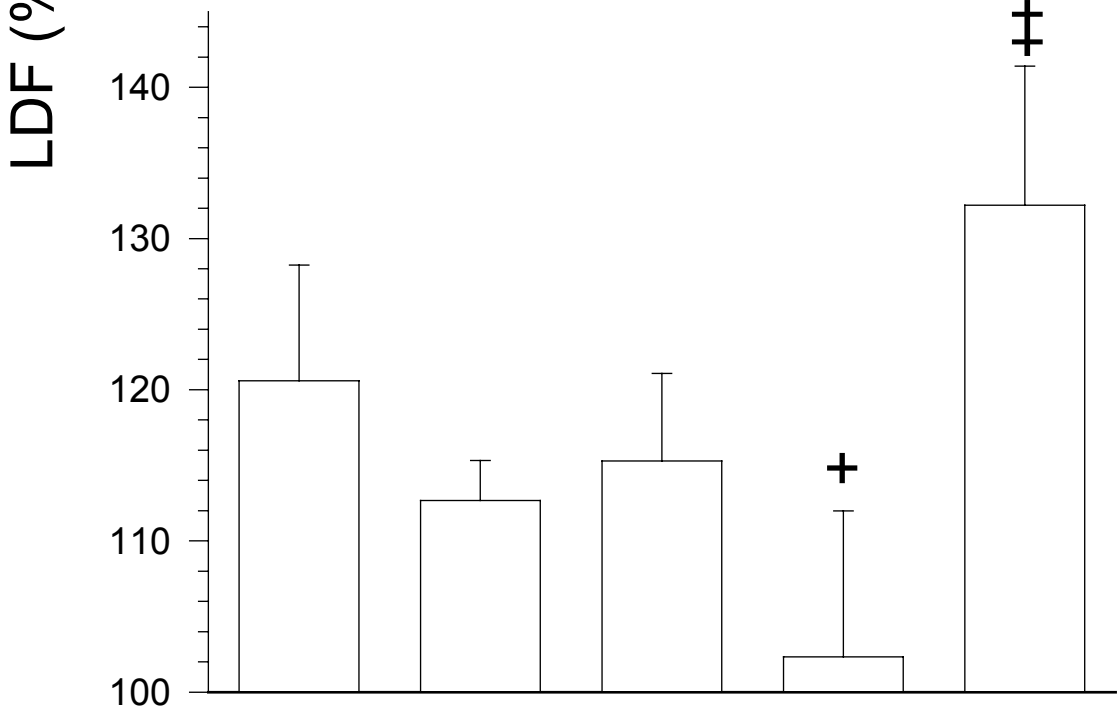


Abb. 5b: Nichtischämische Hemisphäre



LDF (% baseline)

	Sham L-Arg	5 min L-Arg	20 min L-Arg	20 min D-Arg	20 min L-NA & L-Arg
Gruppe	1	2	3	4	5

Abbildung 5 a und b

Antwort des regionalen Blutflußes (rCBF) auf L-Arginin und D-Arginin in der ischämischen und nichtischämischen Hemisphäre. Die Werte sind Mittelwerte ± SD; LDF: Laser-Doppler-Fluß;
(a) In der nichtischämischen Hemisphäre (Kontrolle) zeigte sich ein rCBF-Anstieg nach L-Arginin in allen Gruppen. Die L-NA-Vorbehandlung verstärkte den durch L-Arginin verursachten rCBF-Anstieg (‡ $P < 0,05$, Vergleich mit der korrespondierenden Hemisphäre der Gruppen 1,2,3 und 4; one-way analysis of variance und Student-Newman-Keuls-Test). D-Arginin hatte keinen signifikanten Effekt auf den rCBF (+ $P < 0,05$ Vergleich der Gruppen 1,2,3 und 5;(one-way analysis of variance and Student-Newman-Keuls-Test); (b) Eine 20-minütige, nicht jedoch eine 5-minütige Ischämie reduzierte signifikant den durch L-Arginin induzierten rCBF-Anstieg in der ischämischen Hemisphäre (∗ $P < 0,05$ Vergleich der Versuchsgruppen 1,2 und 5; one-way analysis of variance und Student-Newman-Keuls-Test). Kein signifikanter Unterschied bestand in Bezug auf den L-Arginin induzierten rCBF-Anstieg zwischen den Hemisphären nach 20-minütiger Ischämie ($P<$ 0,05, unpaired Student`s *t*-test). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den rCBF-Werten nach Gabe von L- oder D-Arginin. Die L-NA-Vorbehandlung stellte teilweise die rCBF-Antwort auf L-Argininingabe in der ischämischen Hemisphäre wieder her, trotzdem bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Hemisphären ($P<$ 0,05, unpaired Student`s *t*-test).

3.3. Der Verlauf des LDF/rCBF während Ischämie und Reperfusion mit und ohne L-NA-Vorbehandlung

L-NA verminderte signifikant den präischämischen rCBF in beiden Hemisphären 20min nach L-NA-Gabe. (Ischämische Hemisphäre: 91± 6%; kontralaterale Kontroll-Hemisphäre: 82± 9% der base-line). Dieser Effekt erreichte 30min nach L-NA-Gabe in der kontralateralen Kontrollhemisphäre seinen Höhepunkt (Nichtischämische kontralaterale Hemisphäre: 78± 9% der base-line) und war bis zu der L-Arginin-Gabe nachweisbar.

Das Vorschieben des Fadens führte zu einem vergleichbaren Absinken des CBF in der ischämischen Hemisphäre in den Gruppen 2,3,4 und 5 (Gruppe 2: 32 ± 7% (über 5min); Gruppe 3: 32 ± 7% (über 20min); Gruppe 4: 25 ± 7% (über 20min); Gruppe 5: 31 ± 8% (über 20min)).

Abbildung 6 zeigt den rCBF-Verlauf auf der ischämischen Hemisphäre für die Gruppen 3 und 4 sowie für die Gruppe 5. Mit Beginn der Reperfusion (Zurückziehen des Fadens) kam es in der Gruppe zu einer etwa zwanzigminütigen Hyperperfusion, gefolgt von einer milden Hypoperfusion. Die L-NA-Vorbehandlung reduzierte den Ausgangs-rCBF zum Zeitpunkt 0 und verminderte signifikant die postischämische Hyperperfusion (Gruppe 5: 146± 37%; $P<$ 0,05 verglichen mit Gruppe 3 und 4). Auf die anschließende Hypoperfusion hatte L-NA keinen Einfluß.

Abbildung 6

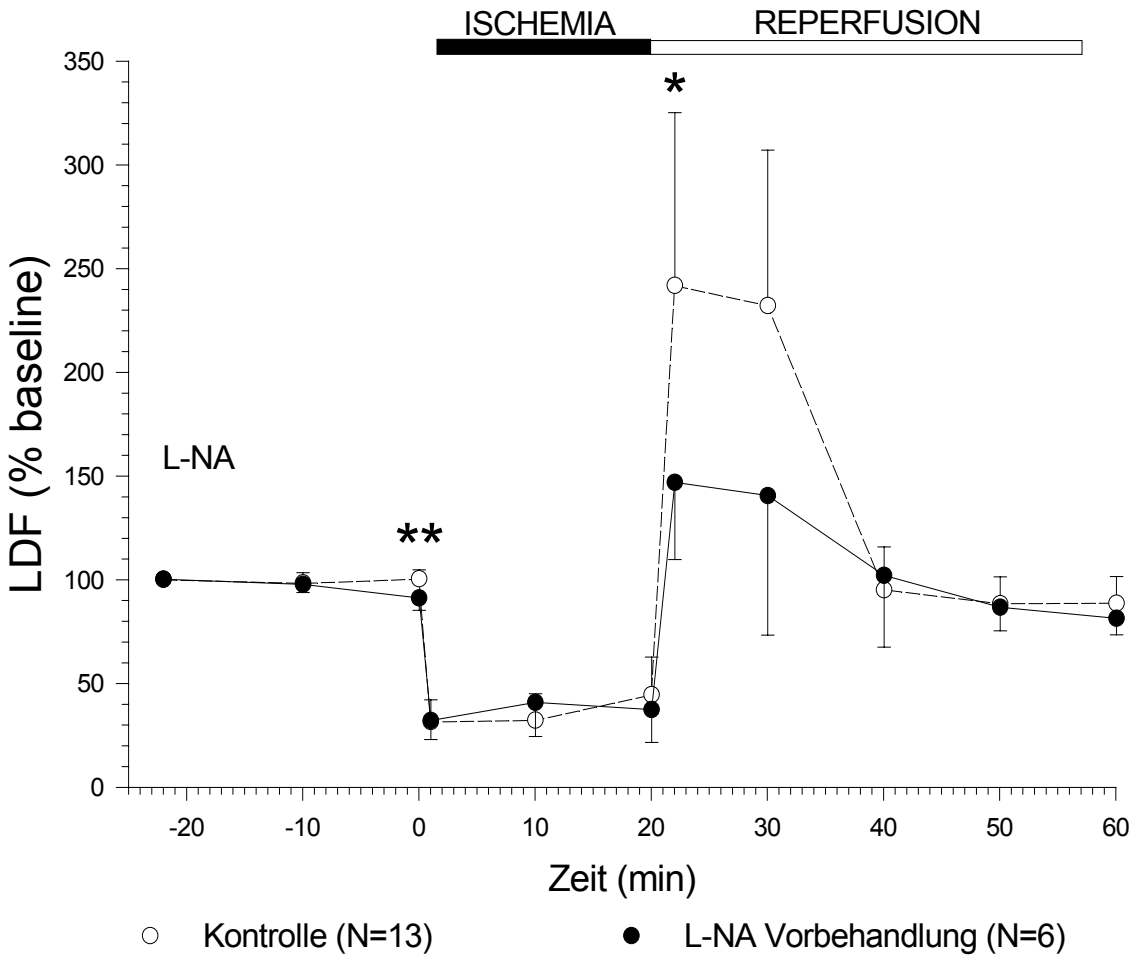


Abbildung 6 zeigt den Effekt der L-Nitro-L-Arginin-Vorbehandlung (L-NA) auf den rCBF bei zwanzigminütiger transienter fokaler Ischämie bei behandelten (Gruppe 5) und unbehandelten Tieren (Gruppe 3 und 4). Die L-NA-Vorbehandlung reduziert den rCBF zwanzig Minuten nach L-NA-Gabe signifikant (∗∗; ungepaarter Students-*t*-Test, *P*< 0,001). Intraischämische rCBF-Werte werden von L-NA nicht beeinflußt. In der Phase der frühen Reperfusion vermindert L-nitro-L-Arginin die Werte des rCBF signifikant (∗; ungepaarter Students-*t*-Test; *P*< 0,05).
LDF (Laser-Doppler-Fluß);↑ (Zeitpunkte an denen die statitischen Analysen durchgeführt wurden); Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standartabweichung.

3.4. Der Einfluß von CO_2 auf den rCBF bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie mit einer 5- und 20-minütigen Ischämie

Bei Versuchsbeginn d.h. präischämisch, war die CO_2-Reaktivität bei allen eingeschlossenen Versuchsgruppen in beiden Hemisphären im physiologischen Normbereich (Meßdaten hier nicht gezeigt).

In der Gruppe 1 (sham-operated ohne Ischämie) war die CO_2-Reaktivität am Versuchsende in beiden Hemisphären im physiologischen Normalbereich (Gruppe 1; Abbildung 7a und b).

Nach 5-minütiger Ischämie war die zerebrale CO_2-Reaktivität in der reperfundierten ischämischen Hemisphäre nicht signifikant reduziert. Die CO_2-Reaktion in der kontralateralen nichtischämische Hemisphäre war normal (Gruppe 2; Abb. 7a und b).

Nach einer 20-minütigen Ischämie war die CO_2-Antwort auf der reperfundierten ischämischen Hemisphäre signifikant vermindert und konnte auch durch L-Arginin nicht wiederhergestellt werden. Die kontralaterale nichtischämische Hemisphäre war normal (Gruppe 3; Abb. 7a und b).

Die Gabe von D-Arginin als Kontrolle hatte keinen signifikanten Einfluß auf die zerebrale CO_2-Reaktivität in beiden Hemisphären (Gruppe 4; Abb. 7a und b).

Die L-NA-Vorbehandlung hatte in der ischämischen Hemisphäre keinen signifikanten Einfluß auf die fast vollständige Reduzierung der CO_2-Reaktivität nach einer 20-minütigen Ischämie (Gruppe 5; Abb. 7a). Auf der kontralateralen nichtischämischen Seite war die CO_2-Reaktivität leicht reduziert ($1{,}78 \pm 0{,}59\%$)(Gruppe 5; Abb.7b).

Abb. 7a:Ischämische Hemisphäre

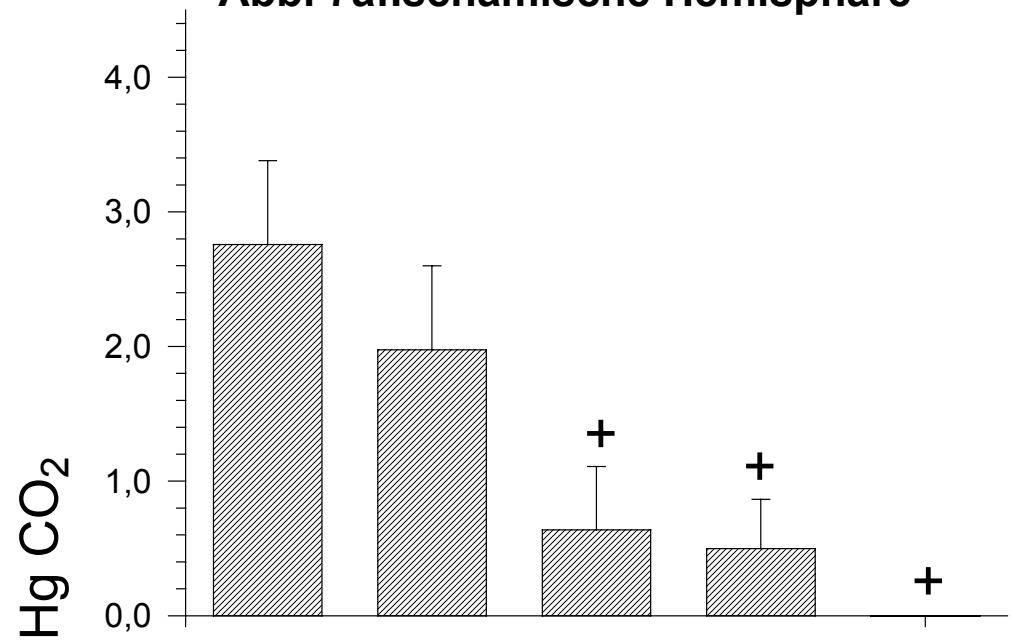
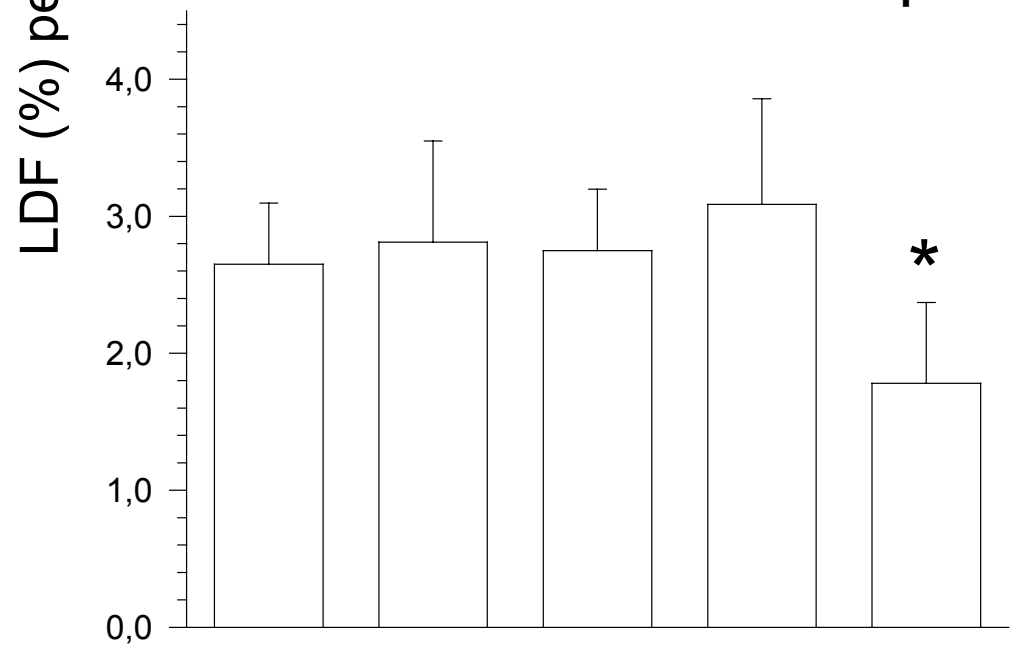


Abb. 7b:Nichtischämische Hemisphäre



LDF (%) per mmHg CO_2

Gruppe	1	2	3	4	5
	Sham L-Arg	5 min L-Arg	20 min L-Arg	20 min D-Arg	20 min L-NA & L-Arg

Abbildung 7 a und b zeigt die CO_2-Reaktivität nach einer transienten fokalen zerebralen Ischämie in der ischämischen und der nichtischämischen Hemisphäre.
(a) In der ischämischen Hemisphäre reduzierte eine 20-minütige, nicht jedoch eine 5-minütige Ischämie die CO_2-Reaktivität signifikant)(+ $P < 0,05$, Vergleich der Gruppen 1 und 2 (one-way-analysis of variance und Student-Newman-Keuls-Test)). Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Unterschied im durch CO_2 induzierten rCBF-Anstieg zwischen den ischämischen und nichtischämischen Hemisphären der Gruppen 3, 4 und 5 ($P< 0,001$, Vergleich der Hemisphären (unpaired Student`s *t*-test).
(b) In den nichtischämischen Hemisphären war die CO_2-Reaktivität in allen Gruppen im Normalbereich (Gruppe 1,2,3 und 4) mit Ausnahme der mit L-NA vorbehandelten Versuchsgruppe. Die L-NA-Vorbehandlung (Gruppe 5) verursachte eine leichte Reduktion der CO_2-Reaktivität (* $P <$ 0,05 Vergleich der Gruppen 1,2,3,4 und 5 (one-way-analysis of variance und Student-Newman-Keuls-Test)); LDF: Laser-Doppler-Fluß; Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± SD.

Tabelle 2:

Werte der Blutgasanalyse während der systemischen Hyperkapnie

	Präischämie			**Postischämie**		
Versuchs-Gruppe	**pCO_2** (mmHg)	**pH**	**pO_2** (mmHg)	**PCO_2** (mmHg)	**PH**	**pO_2** (mmHg)
1	59.4 ± 5.7	7.23 ± 0.03	113 ± 11.3	60.5 ± 7.8	7.22 ± 0.03	115 ± 11.5
2	61.7 ± 7.0	7.21 ± 0.04	120 ± 14.5	61.3 ± 5.7	7.20 ± 0.03	111 ± 8.5
3	60.3 ± 4.6	7.21 ± 0.02	112 ± 7.4	59.6 ± 5.3	7.21 ± 0.02	110 ± 7.8
4	61.2 ± 6.5	7.21 ± 0.03	113 ± 11.3	61.2 ± 5.2	7.20 ± 0.02	114 ± 6.5
5	59.1 ± 6.3	7.22 ± 0.03	109 ± 9.9	59.0 ± 7.4	7.22 ± 0.03	108 ± 6.9

Tabelle 2:
Tabelle 2 zeigt die Werte der Blutgasanalyse der systemischen Hyperkapnie 30 min vor Beginn der Ischämie (Präischämie) und 90 min nach Beginn der Reperfusion (Postischämie).
Die Ausgangswerte und der Blutgasanalysen vor Hyperkapnie waren im physiologischen Normbereich. Ebenso waren die Blutgaswerte 10 Minuten nach der Hyperkapnie wieder im physiologischen Normbereich (Meßwerte hier nicht gezeigt).
Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standartabweichung

4. Diskussion

4.1. Allgemein

4.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß L-Arginin den regionalen zerebralen Blutfluß (rCBF) in beiden Hemisphären, der nichtischämischen sowie auch in der ischämischen Hemisphäre des Hirnes steigert. Eine 5-minütige transiente fokale zerebrale Ischämie reduzierte diesen durch L-Arginin hervorgerufen Anstieg des rCBF nicht. Bei einer 20-minütigen transienten fokalen zerebralen Ischämie jedoch war der durch L-Arginin hervorgerufene Anstieg des rCBF signifikant abgeschwächt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß eine Vorbehandlung mit dem unselektiven Stickstoffmonoxid-synthasehemmer (NOS-Inhibitor) N-$^{\Omega}$-nitro-L-Arginin (L-NA) in der ischämischen Hemisphäre den durch L-Arginin hervorgerufenen und durch die 20-minütige Ischämie verminderten Anstieg des rCBF teilweise wiederherstellen konnte.

In ähnlicher Weise konnte eine 5-minütige Ischämie die postischämische zerebrale CO_2-Reaktivität der Gefäße nicht signifikant vermindern, jedoch die 20-minütige Ischämie. In Gegensatz zur L-Arginin-Reaktion reduzierte die L-NA-Vorbehandlung die zerebrale CO_2-Reaktivität in der nichtischämischen Hemisphäre und eliminierte sie in der ischämischen Hemisphäre.

4.1.2. Validität und Grenzen des verwendeten Tiermodells bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie

In den hier vorgestellten Untersuchungen zu einer transienten fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte wurde das Intraluminale-Faden-Okklusions-Modell von Longa et al. verwendet (Longa et al., 1989). Bei diesem Ischämiemodell wird die Arteria cerebri media (MCA) mittels eines von der Arteria carotis communis (CCA) intraluminal vorgeschobenen monofilären Fadens verschlossen. Dies erzeugt eine Ischämie im Mediastromgebiet.

Im Gegensatz zu anderen Ischämiemodellen (Laas et al., 1983; Koizumi et al., 1985) liegen die Vorteile dieser Methode bei der einfachen relativ gering invasiven Art der Ischämieinduktion ohne Kraniotomie. Mit dieser Methode ließ sich eine stabile Verminderung der zerebralen Durchblutung im betroffenem Gebiet auf 20-30% des Ausgangswertes erreichen (Longa et al.,1989; siehe auch eigene Werte Kap.3). Die Infarktgrößen sind bei diesem Modell als relativ konstant anzusehen, jedoch war dies nicht Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit und wurde auch nicht kontrolliert. Die hier untersuchten Veränderungen der zerebralen Durchblutung wurden mittels der Laser-

Doppler-Methode durchgeführt. Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Wiedereröffnung der MCA durch einfaches Zurückziehen des Fadens für die Einleitung der Reperfusion. Durch den Einsatz der Laser-Doppler-Messung konnte die Reperfusion kontrolliert und über die Zeit verfolgt werden. Jedoch kann dieses Modell des mechanischen transienten Mediaverschlußes nur sehr eingeschränkt mit der Situation eines thrombotischen Mediaverschlußes bei Menschen verglichen werden. Der mechanische Verschluß eines Gefäßes vernachlässigt völlig die Interaktionen eines festsitzenden Thrombus mit dem Endothel und dem Gerinnungssystem (Hossmann, 1997; Prado et al., 1996). Zudem läßt sich eine downstream Irritation des Endothels durch den Faden nicht mit Sicherheit ausschließen.

Auch unterscheidet sich das Modell einer transienten Okklusion mit anschließender Reperfusion stark von einer permanenten Okklusion. In der Reperfusion kommt es zu einer Wiederdurchblutung der verschlossenen Gefäße und somit zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Substraten. So ist es möglich, daß die sauerstoffabhängigen Reaktionen wieder ablaufen können, möglicherweise gesteigert, und es kommt zum Reperfusionsschaden.

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

4.1.3. Validität und Grenzen der zerebralen Blutflußmessung mittels der Laser-Doppler-Methode

Die hier vorgestellten Untersuchungen zu Blutflußveränderungen bei einer transienten fokalen zerebralen Ischämie bei der Ratte wurden mittels der Laser-Doppler-Methode durchgeführt.

Die LDF-Methode liefert keine absoluten Blutflußwerte (in ml/100g/min) gestattet aber die Angabe relativer Blutflußveränderungen als Prozentveränderungen vom Ausgangswert (Smits et al., 1986). In den vergangenen Jahren wurde die LDF-Methode an den verschiedensten Organen (z.B. Haut und Zentralnervensystem) mit Standardblutflußmethoden validiert. Im Zentralnervensytem wurde die Laser-Doppler-Blutflußmessung mit etablierten Methoden, wie der Hydrogen-Clearance-Methode, der ^{14}C-Iodoantipyrin-Autoradiographie, der Videometrie oder der Mikrosphärentechnik verglichen (Dirnagl et al., 1989; Haberl et al., 1989a; Haberl et al., 1989b). Alle Studien zeigten eine exzellente Übereinstimmung der LDF-Methode mit der jeweiligen

Referenztechnik bei der Messung prozentualer Blutflußveränderungen, jedoch nicht bei der Bestimmung absoluter Blutflußwerte.

Der Vorteil der Laser-Doppler Methode liegt in der hohen zeitlichen Auflösung, ihrer geringen Invasivität und ihrer einfachen Durchführbarkeit. Nachteil der Methode ist, daß sich keine Absolutwerte der Durchblutung messen lassen und daß sich auch keine Aussage über die regionale Verteilung des Blutflusses in der gesamten Hemisphäre machen läßt. Auch wird die Penumbra nicht als Ganzes erfaßt, sondern nur das kleine Meßareal. Als Meßareal wählten wir auf beiden Hemisphären einen Punkt 5 bis 6 mm lateral der Mittellinie und 1 bis 2 mm caudal des Bregmas. Dieser Punkt liegt in der Peripherie des Mediaversorgungsgebietes und der Verschluß der Arteria cerebri media bewirkt einen Abfall der Durchblutung auf 20 bis 30% des Ausgangswertes. Laut Literatur ist dieses Areal der Penumbra gleichzusetzen (Dirnagl, 1993). Eine schwächere Reduktion der Durchblutung hatte zum Ausschluß des Versuches geführt.

4.2. Der Einfluß von L-Arginin/Stickstoffmonoxid, N-$^{\Omega}$-nitro-L-Arginin und der Hyperkapnie auf den zerebralen Blutfluß bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie mit unterschiedlichen Ischämiezeiten

4.2.1. Der Einfluß von exogen zugeführtem L-Arginin auf den regionalen zerebralen Blutfluß

Die Art und Weise wie exogen zugeführtes L-Arginin wirkt, wird noch kontrovers diskutiert. Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß die L-Argininkonzentration von kultivierten Endothelzellen im Bereich von 100µmol/L bis 800µmol/L liegt. Selbst in einem L-Arginin freien Medium war nach 24h die L-Argininkonzentration noch 200µmol/L und auch die NO-Produktion war nur marginal reduziert (Baydoun et al., 1990, Gold et al., 1989 und Hecker et al., 1990). Diese Untersuchungen zeigen, daß endogenes L-Arginin in Mengen vorliegt, die weit über der Michaeliskonstante (Km) der NO-Synthase (NOS) liegt. Die Km der endothelialen NOS z. B. beträgt 2,9µmol/L (Baydoun et al., 1990). Somit liegt die Vermutung nahe, daß die therapeutische Gabe von exogen zugeführtem L-Arginin die Syntheserate von NO nicht erhöhen dürfte, da die NO-Synthasen bei dieser Konzentration voll abgesättigt sein müßten. Trotzdem gibt es auch verschiedene andere Studien, die belegen, daß sowohl eine topische, als auch eine systemische Applikation von L-Arginin einen rCBF-Anstieg induzieren kann. Dabei spielt es keine Rolle, ob sich dies unter physiologischen oder unter pathologischen Gegebenheiten abspielt (Morikawa et al., 1992a, Morikawa et al., 1992b; Morikawa et al., 1994, Riedel et al., 1995).

In der Literatur werden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für das sogenannte „L-Arginin-Paradoxon“ diskutiert (Förstermann et al. 1994).
Erstens könnte die „funktionale“ Michaeliskonstante (Km) in intakten Zellen höher sein als die des purifizierten Enzyms (Arnal et al., 1995).
Zweitens wäre eine Sequestration oder eine Kompartmentalisation des L-Arginins innerhalb der Endothelzelle denkbar, die die Schwankungen der L-Argininkonzentration in der Nachbarschaft der NOS gering halten sollen, jedoch nach einer Ischämie in der Reperfusionsphase gestört sind (Arnal et al. 1995).
Drittens könnte ein endogener Inhibitor der NOS oder ein endogener L-Argininantagonist z.B. N-Monomethyl-L-Arginin (NMMA) oder N,N-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) einen erhöhten Bedarf an L-Arginin erforderlich machen, so daß eine Konzentrationerhöhung durch Gabe von L-Arginin die NOS erst in einem optimalen Bereich arbeiten ließe (Faraci et al.,1995 und Vallance et al., 1992).
Viertens wäre ein inadäquater Transport von L-Arginin über die Zellmembran denkbar. L-Arginin wird über einen Carrier, der spezifisch für kationische Aminosäuren (System Y^+) ist (White, 1985) und der eine erleichterte Diffusion möglich macht, über die Zellmembran befördert (White, 1985; Förstermann et al., 1994).
Schließlich könnte möglicherweise die NO-Freisetzung auch durch einen indirekten Mechanismus bewirkt werden. So wird in der Untersuchung von Arnal et al. berichtet, daß L-Arginin den inhibitorischen Effekt von L-Glutamin auf die rezeptorvermittelte NO-Freisetzung umzukehren vermag (Arnal et al. 1995).

4.2.2. Die Wirkung von exogen zugeführtem L-Arginin nach einer zerebralen Ischämie

In verschiedenen experimentellen Schlaganfallmodellen verursacht die Applikation von exogenem L-Arginin eine Verkleinerung des Infarktvolumens. Dieser protektive Effekt der L-Arginin-Therapie ist wahrscheinlich durch einen Anstieg des rCBF in der Penumbra verursacht (Anderson et Meyer, 1996; Ashwal et al., 1994; Coert et al., 1999; Morikawa et al., 1992 a und b; Morikawa et al., 1994; Regli et al., 1996; Zhang et Iadecola, 1994). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die von einer Steigerung des Infarktvolumens berichten (Anderson et Meyer, 2000; Hamada et al., 1995; Kuluz et al., 1993; Yamamoto et al., 1992). Diese widersprüchlichen Befunde lassen sich zum Teil durch das unterschiedliche Prozedere der Versuche, wie Art und Dosierung des L-Argininanalogons, des Zeitpunktes und der Applikationsart und -weise, der Art und Dauer der Ischämie und der Art der Auswertung des Gewebsschadens erklären.
So berichten Morikawa et al. (Morikawa et al.,1992a; Morikawa et al., 1994), daß eine permanente Ischämie durch den Verschluß der Arteria cerebri media bei spontan

hypertensiven Ratten und bei Sprague-Dawley-Ratten die frühe Gabe von L-Arginin in einer Konzentration von 30 und 300mg/kg KG intravenös den rCBF im Bereich der Arteria cerebri media (MCA) steigert und gleichzeitig das Infarktvolumen dieses Versorgungsgebietes reduziert. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur, wenn die L-Argininingabe zu einem frühen Zeitpunkt in der Ischämie (hier 5 Minuten nach Ischämiebeginn) erfolgte. Ähnliche Ergebnisse zeigte Dalkara 1994 bei einem Rattenmodell mit fokaler zerebraler Ischämie bei spontan hypertensiven Ratten. Dort führte eine L-Argininapplikation bei früher Gabe zu einem signifikant größeren Anstieg des rCBF als bei späterer Applikation (Dalkara et al., 1994).

In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, daß eine späte L-Argininingabe 45 min nach Reperfusionsbeginn den rCBF bei einer fünfminütigen transienten zerebralen Ischämie zu steigern vermag. Diese Steigerung des rCBF war bei einer zwanzigminütigen transienten Ischämie in der ischämischen Hemisphäre vermindert, nicht jedoch in der nichtischämischen Hemisphäre. Die Applikation von D-Arginin als Kontrolle für die Wirkung von L-Arginin, führte weder in der ischämischen noch in der nichtischämischen Hemisphäre zu einer Steigerung des CBF.

Im Gegenzug zu den vorgenannten Untersuchungen berichtet Prado et al. bei einem photothrombotischen Okklusionsmodell der Arteria cerebri media bei spontan hypertensiven Ratten, daß weder ein Anstieg des rCBF noch eine Reduktion des Infarktvolumens durch eine Applikation von L-Arginin zu einem frühen oder zu einem späten Zeitpunkt in der Ischämie zu erreichen war (Prado et al., 1996).

Diese widersprüchlichen Befunde könnten auf die unterschiedlichen Tierversuchsmodelle, auf der einen Seite mechanische Okklusion mittels eines Fadens, auf der anderen Seite eine Okklusion mittels eines intravital erzeugten Thrombus zurückzuführen sein. Die Ischämie wird bei dem photothrombotischen Okklusion-Modell durch eventuell unkontrollierte Thrombenbildung verkompliziert. Auch erleidet ein Gewebe, das einer Ischämie und zusätzlich einer Thrombose ausgesetzt ist schwerwiegendere Veränderungen als ein Gewebe, das nur einer mechanisch induzierten Ischämie ausgesetzt war (Dietrich et al., 1989; Hossmann, 1997; Prado et al., 1996). Die Thrombose in Kombination mit der Ischämie könnte den Perfusionsschaden möglicherweise durch die Ausschüttung von Substanzen der Thrombozyten aggravieren (Dietrich et al., 1988, Wester et al., 1992 und Prado et al., 1996). Auch gilt NO als Inhibitor der Thrombozytenaggregation und -adhäsion und Neutrophilenadhäsion, die die postischämische Reperfusion durch Thrombenbildung vermindern und verzögern können (Kubes et al., 1991; Kumura et al., 1994; Moncada et al., 1992). Bei der mechanisch induzierten MCA-Okklusion scheint der positive Effekt der L-Arginin-Therapie von dem

Zeitpunkt der Applikation nach Beginn der Ischämie und der Dauer der Ischämie abzuhängen.

4.2.3. Die NO-Produktion in einem ischämischen Gewebe nach einer länger-dauernden Ischämie

Wir überlegen, ob der Grund für den Verlust der Gefäßreaktivität bei länger dauernder Ischämie entweder in einer verminderten NO-Produktion des Endothels selbst oder in einem vermindertem Ansprechen der glattgestreiften Muskulatur der Gefäße auf das produzierte NO liegt (Dalkara et al., 1994).

Die Aktivität der NO-Synthase und die NO/Nitrit-Konzentration im ischämischen Gewebe wurde von verschiedenen Gruppen in einen MCA-Okklusionsmodell ohne Reperfusion der Ratte gemessen (Kader et al., 1993; Malinski et al., 1993; Ohta et al., 1996; Sugimura et al., 1998; Zhang et al., 1994). Dabei fanden sich folgende Befunde. Die NO/Nitrit-Konzentration steigt zu Beginn der Ischämie für 20min an wobei das Maximum zwischen der zehnten und der zwanzigsten Minute liegt (Peakkonzentration von NO 2,7$\pm$1,0μM bei 11,3$\pm$8,0 min nach Ischämiebeginn (Malinsky et al., 1993)). Sechzig Minuten nach Beginn der Ischämie fiel die NO/Nitrit-Konzentration wieder auf ihre Ausgangswerte zurück (Kader et al., 1993 und Malinsky et al., 1993).

Mit der NO-Synthaseaktivität Isoform I verhält es sich ähnlich. Die NO-Synthaseaktivität steigt durchschnittlich 10min nach Beginn der Ischämie um den Faktor 10 der Ausgangswerte an und hat zwischen der zehnten und der zwanzigsten Minute ihr Maximum. Sechzig Minuten nach Beginn der Ischämie erfolgt ein dramatischer Abfall der NO-Synthaseaktivität Isoform I (Kader et al., 1993). Die Reperfusion bei zweistündigen Ischämien bewirkt einen Anstieg der NO-Konzentration über Werte der base-line für mindestens eine Stunde (Malinski et al., 1993). Auch konnten Heinzel et al. und Hecker et al. zeigen, daß die Aktivität der NOS und damit die NO-Produktion vom intrazellulären pH abhängig ist (Hecker et al., 1994; Heinzel et al., 1992).

In unserer Studie bewirkt die Vorbehandlung mit dem NO-Synthasehemmer L-NA eine Verringerung der postischämischen Hyperämie bei Beginn der Reperfusion.

Ähnliche Ergebnisse finden Greenberg et al. und Sadoshima et al. in einer früheren Studie bei Ferkeln respektive spontan hypertensiven Ratten. In diesen Studien verringert die Hemmung der NO-Synthase mit L-NAME respektive L-NA die postischämische Hyperämie nach einer globalen zerebralen Ischämie respektive fokaler zerebraler Ischämie (Greenberg et al., 1995; Sadoshima et al., 1997).

Diese Untersuchungsbefunde legen die Vermutung nahe, daß bei kurzzeitigen Ischämien in der Frühphase der Reperfusion sowohl die NO-Produktion als auch die Antwort der

glatten Muskulatur auf NO noch intakt ist. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich in den hier vorgestellten Befunden zeigen.

4.2.4. Hypothese: Hemmen NO-Metaboliten die L-Arginin-Antwort in der Reperfusionsphase?

Da der NO-Anstieg in der Reperfusionphase (Malinski et al., 1993; Sadoshima et al., 1997) die Integrität der NO-Synthese zeigt, nehmen wir an, daß die Ineffektivität der L-Arginin-Therapie durch die reduzierte Antwort der glatten Gefäßmuskulatur auf NO verursacht ist.

Die Schäden am mikrovaskulären Gefäßbett könnten durch die Ausschüttung von zytotoxischen Substanzen zum Beispiel NO und deren reaktiven Sauerstoffradikalen wie z.B. Peroxynitrit und Superoxid-Anionen verursacht sein. Ähnlich wie NO, werden auch Superoxid-Anionen, welche in höherer Konzentration nur nach Ischämie entstehen, während der Reperfusion produziert und ausgeschüttet (Nelson et al., 1992; Schreiber et al., 1995).

Die gemeinsame Produktion von NO und Superoxid-Anionen mag die Bildung des zytotoxisch wirksamen Peroxinitrit-Anion begünstigen (Beckmann, 1990; Beckmann et al., 1990), das eine Vielzahl von zytopathischen Effekten auslöst. So könnte Peroxinitrit-Anion selbst die Gefäße angreifen, inklusive der Initiation der Oxidation der Lipide der Zellmembran (Rubbo et al., 1994) und der Inhibition des mitochondralen Elektronentransportes (Radi et al., 1994), und so die L-Arginin-Antwort verhindern. Die Verbesserung des von L-Arginin/NO induzierten rCBF-Anstieges durch die L-NA-Vorbehandlung in unserer Untersuchung könnte von der Reduktion dieser zytotoxischen Substanzen durch L-NA verursacht sein.

Während die L-Arginin-Reaktivität durch die L-NA-Vorbehandlung teilweise wiederhergestellt werden konnte, blieb die durch Hyperkapnie ausgelöste Vasodilatation aufgehoben. Ähnlich zu unserer Studie zeigen frühere Studien, daß die Antwort des rCBF auf die Hyperkapniereaktion nicht nur im Kerngebiet des Infarktes, sondern auch in der Penumbra wenn nicht aufgehoben, so doch stark eingeschränkt ist (Jones et al., 1989). Der Grund für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse der L-NA-Vorbehandlung in Bezug auf den L-Arginin-Effekt und die Hyperkapniereaktion ist ungeklärt. So legen einige frühere Untersuchungen die Vermutung nahe, daß NO nur der Mediator der Gefäßdilatation in dem Bereich bis 100mmHg $PaCO_2$ der Hyperkapniereaktion des Hirnes ist. In unserer Untersuchung wurde die Hyperkapniereaktion mit einer Verdopplung des physiologischen $PaCO_2$ durchgeführt und liegt somit im Bereich bis 100mmHg $PaCO_2$.

So weisen verschiedene Studien auf ein Vorliegen von NO-abhängigen (d.h. NO ist der Mediator für die rCBF-Antwort auf die Hyperkapniereaktion) und NO-unabhängigen

Mechanismen z.B. einer Azidose und/oder Prostacyclinen, der Vasodilatation hin (Iadecola and Zhang, 1994 und Wang et al., 1994).

Zusätzlich scheinen auch die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase eine Rolle zu spielen, z.B. die endotheliale NOS bei der durch L-Arginin induzierten Vasodilatation und die neuronale NOS bei der Vasodilatation durch eine Hyperkapnie (Dawson, 1994; Iadecola et al., 1994; Wang et al., 1995). Dies wurde jedoch in unserer Untersuchung nicht untersucht, da wir den unselektiven NOS-Hemmer L-NA benutzt haben.

Der Unterschied in der Wiederherstellung der Gefäßantwort durch L-NA stützt die Hypothese, daß nach einer transienten fokalen Ischämie eine selektive Vulnerabilität der Gefäßwandreaktivität, jedoch kein globaler Verlust der Zellgefäßantwort existiert.

5. Zusammenfassung

Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß beim ischämischen Schlaganfall die Regulation der Durchblutung in der Penumbra gestört ist. Chancen für eine Schlaganfalltherapie liegen daher in der Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung in der Penumbra.

Tierexperimentell konnte gezeigt werden, daß die essentielle Aminosäure L-Arginin die Hirndurchblutung in und um fokale Hirnläsionen verbessert und dadurch möglicherweise Hirninfarkte verkleinert. Der postulierte Mechanismus ist die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch Stickstoffmonoxidsythase (NOS) mit L-Arginin als Substrat. NO ist als ein Vasodilatator zerebraler Gefäße bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von L-Arginin in der Reperfusionsphase nach transienter fokaler Ischämie mit unterschiedlicher Ischämiedauer zu untersuchen.

Hierzu wurden bei narkotisierten, beatmeten Ratten der regionale zerebrale Blutfluß während und nach fokaler zerebraler Ischämie mit anschließender Reperfusion (Fadenmodell der transienten zerebralen Ischämie) kontinuierlich gemessen. Der regionale zerebrale Blutfluß (rCBF) wurde mit der Laser-Doppler-Blutflußmethode simultan in beiden Hirnhemisphären registriert. Es wurden der Einfluß der Aminosäure L-Arginin (L-Arg), des Stickstoffmonoxidsynthasehemmers N-$^{\Omega}$-nitro-L-Arginin (L-NA) und von CO_2 (Hyperkapnie) in der Reperfusionsphase auf den rCBF einer transienten fokalen zerebralen ischämie unterschiedlicher Länge (5 und 20 Minuten) untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Hyperkapnie und L-Arginin den CBF im nichtischämischen Hirn (sham-Kontrollen und nichtischämische Hemisphäre) erhöhten. D-Arginin veränderte den CBF nicht. In der Reperfusionsphase nach 20-minütiger Ischämie ist die CBF-Reaktion auf L-Arginin und Hyperkapnie signifikant reduziert. Eine 5-minütige Ischämie hatte keinen Einfluß. Eine Vorbehandlung mit L-NA, einem unselektivem NOS-Inhibitor, stellt die Reaktivität auf L-Arginin nach 20 minütiger Ischämie teilweise wieder her, nicht jedoch die Hyperkapnieantwort.

Wir schließen aus den Ergebnissen, daß der Vasodilatator L-Arginin nur nach sehr kurzfristiger Ischämie eine Verbesserung der Durchblutung in der Penumbra bewirkt und deswegen als klinische Therapie nicht vielversprechend ist.

Allerdings zeigen die Versuche mit dem unselektiven NOS-Inhibitor L-NA, daß der Verlust der Vasoreaktivität nach längerdauernder Ischämie nicht einer generellen Vasoparalyse gleicht kommt, sondern selektiv beeinflußbar ist. Aus dem derzeitigen Kenntnisstand läßt sich als therapeutische Konsequenz ableiten, daß eine L-Argininfusion nach einer zerebralen Ischämie zur Steigerung des zerebralen Blutflusses in der Penumbra als nicht sinnvoll erscheint.

6. Literaturverzeichnis

1) Adachi T, Inanami O, Saito A (1992)
Nitric oxide (NO) is involved in increased cerebral cortical blood flow following stimulation of the nucleus basalis Meynert in anesthetized rats. *Neurosci Lett 139: 201-204*

2) Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL (1996)
Immunologic NO synthase: elavation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science 274: 1917-1921*

3) Alberti E, Hoyer S, Hamer J, Stoeckel H, Packschiess P, Weinhardt F (1975)
The effect of carbon dioxide on cerebral blood flow and cerebral metabolism in dogs. *Br J Anaest 47: 941-947*

4) Alexander SC, Smith TC, Strobel G, Stephen GW, Wollman H (1968)
Cerebral carbohydrate metabolism of man during respiratory and metabolic alkalosis. *J Appl Physiol 24: 66-72*

5) Anderson RE, Meyer FB (1996)
Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME during repetitive focal cerebral ischemia in rabbits. *Am J Physiol 271: H588-H594*

6) Anderson RE, Meyer FB (2000)
Is intracellular brain pH a dependent factor in NOS inhibition during focal cerebral ischemia? *Brain Res 856: 220-226*

7) Arnal JF, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG (1995)
Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest 95: 2565-2572*

8) Ashwal S, Cole DJ, Osborne TN, Pearse WJ (1994)
Dual effects of L-NAME during transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol 267: H276-H284*

9) Ashwal S, Tone B, Tian HR, Cole DJ, Liwnicz BH, Pearce WJ (1999)
Core and pnumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion in the rat pup. *Pediatr. Res 46(4): 390-400*

10) Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981)
Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke 12: 723-725*

11) Baydoun AR, Emery PW, Pearson JD, Mann GE (1990)
Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentration in cultered bovine aortic endothelian cells. *Biochem Biophys. Res. Commun. 173: 940-948*

12) Beckman JS (1990)
Ischemic injury mediators. *Nature 345: 27-28*

13) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990)
Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Acad. Natl. Sci USA 87: 1620-1624*

14) Berntman L, Dahlgren N, Siesjö BK (1979)
Cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat brain during extreme hypercarbia. *Anesthesiology 50: 299-305*

15) Bonvento G, MacKenzie ET, Edvinsson L (1991)
Serotonergic innervation of the cerebral vasculature, relevance to migraine and ischemia. *Brain Res Rev 16: 257-263*

16) Bredt DS, Synder SH (1990)
Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA 87: 682-685*

17) Chabrier PE, Auguet M, Spinnewyn B, Auvin S, Cornet S, Demerle-Pallardy C, Guilmard-Favre C, Marin JG, Pignol B, Gillard-Roubert V, Roussillot-Charnet C, Schulz J, viossat I, Bigg D, Moncada S (1999)
BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: A promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad USA Sept 14; 96(19): 10824-10829*

18) Chang J-Y, Hardebo JE; Owman C (1990)
Kinetic studies on uptake of serotonin and noradrenaline into pial arteries of rats. *J Cereb Blood Flow Metab 10: 22-31*

19) Coert BA, Anderson RE, Meyer FB (1999)
A comparative study of the effects of two nitric oxide synthase inhibitors and two oxide donors on temporary focal cerebral ischemia in the Wistar rat. *J Neurosurg 90(2): 332-338*

20) Dalkara T, Morikawa E, Panahian N, Moskowitz MA (1994)
Blood flow-dependent functional recovery in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am J Physiol 267: H678-H683*

21) Dalkara T, Moskowitz MA (1994)
The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol. 4: 49-57*

22) Dawson TM, Steiner SP, Dawson VL, Dinermann JL, Uhl GR, Synder SH (1993)
Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA 90: 9808-9812*

23) Dawson DA (1994)
Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev 6: 299-324*

24) Dawson V, Brahmbhatt HP, Mong JA, Dawson TM (1994)
Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology. 33: 1425-1430*

25) Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Synder SH, Dawson TM (1996)
Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase deficient mice. *J Neurosci. 16: 2479-2487*

26) Dietrich WD, Prado R, Watson BD (1989)

Photochemically stimulated bloo-borne factors induce blood-brain-barrier alterations. *Stroke 19: 857-862*

27) Dirnagl U (1993)
Cerebral ischemia: the microcirculation as trigger and target. *Prog Brain Res 96: 49-64*

28) Dirnagl U, Lindauer U, Villringer A (1993)
Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett. 149: 43-46*

29) Dirnagl U, Pulsinelli W (1990)
Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab 10: 327-336*

30) Faraci FM, Brian JE, Jr, Heistad DD (1995)
Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol 269: H1522-H1527*

31) Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Ihii K, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1990)
Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol. 38: 7-13*

32) Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F (1991a)
Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA 88: 1788-1792*

33) Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Heller M, Murad F (1991b)
Enzymes synthesizing guanylate cyclase-activating factors in endothelial cells, neuroblastoma cells, and rat brain. *J Cardiovasc Pharmacol 17 (Suppl 3): S57-S64*

34) Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994)
Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension 23: 1121-1131*

35) Furchgott RF, Zawadzki JV (1980)
The obligatory role of the endotheliale cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature 27; 288 (5789): 373-6*

36) Gold ME, Bush PA, Ignarro LJ (1989)
Depletion of arterial L-arginine causes reversible tolerance to endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 714-721*

37) Golding EM, Robertson CS, Bryan Jr. RM (2000)
L-Arginine partially restores the diminished CO_2 reactivity after mild controlled cortical impact in the adult rat. *J Cerebr Blood Flow Metab 20: 820-828*

38) Greenberg RS, Helfaer MA, Kirsch JR, Traystman RJ (1995)
Effect of nitric oxide synthase inhibition on postischemic cerebral hyperemia. *Am J Physiol 38: H341-H347*

39) Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF (1989a)
Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. *Am J Physiol. 256 (Heart Circ. Physiol. 25): H1247-H1254*

40) Haberl RL, Heizer ML, Ellis EF (1989b)
Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. *Am J Physiol. 256 (Heart Circ. Physiol. 25): H1255-H1260*

41) Hamada J, Greenberg JH, Croul S, Dawson TM, Reivich M (1995)
Effects of central inhibition of nitric oxide synthase on focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab 15: 779-786*

42) Hara H, Huang HL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996)
Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cerebr Blood Flow Metab. 16:605-611*

43) Hardebo JE, Arbab M, Suzuki N, Svendgaard NA (1991)
Pathways of parasympathetic and sensory cerebrovascular nerves in monkeys. *Stroke 22: 331-342*

44) Harder DR (1984)
Pressure-dependent membrane depolarisation in cat middle cerebral artery. *Circ Res 55: 197-202*

45) Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR (1990)
Endothelian cells metabolize N-monomethyl-L-arginine to l-citrlline and subsequently to L-arginine. Biochem. *Biophys. Res. Commun. 167: 1037-1043*

46) Hecker M, Mülsch A, Busse R (1994)
Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem 62: 1524-1529*

47) Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B (1992)
Ca^{2+}/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J 281: 627-630*

48) Hevel JM, Marletta MA (1992)
Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. *Biochemistry 31: 7160-7165*

49) Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW (1994)
Selective potentation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron 13: 487-494*

50) Hirabayashi H, takizawa S, Fukuyama N, Shinohara Y (1999)
7-Nitroindazole attenuates nitrotyrosine formation in the early phase of cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Neurosci Lett 1999 Jun 18; 268 (2): 111-113*

51) Hossmann KA (1997)
Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock Vol 8 No 2; pp 95-101*

52) Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994)
Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science 265: 1883-1885*

53) Huang PL, Huang ZH, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC 1995
Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature 377: 239-242*

54) Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA (1996)
Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab 16: 981-987*

55) Iadecola C (1992)
Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci USA 89: 3913-3916*

56) Iadecola C, Ebner T (1993a)
Focal elevations in lokal blood flow elicited by microstimulation of the paraellel fiber system of the cerebellar cortex. *J Cereb Blood Flow Metab Suppl 13:122*

57) Iadecola C, Zhang F, Xu X (1993b)
Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. *Am J Physiol 264: 738-746*

58) Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA (1994)
Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab 14: 175-192*

59) Iadecola C, Zhang F (1994)
Nitric oxide-dependent and –independent components of cerebrovasodilatation elicited by hypercapnia. *Am J Physiol 266: R564-R552*

60) Iadecola C, Xu X (1994)
Nitro-L-arginine attenuates hypercapnic cerebrovasodilation without affecting cerebral metabolism. *Am J Physiol 266; R5 518-25*

61) Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME (1995)
Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab 15: 378-384*

62) Iadecola C, Zhang F, Casey R, Ross ME (1996)
Knockout mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene are resistant to cerebral ischemia. *Soc Neurosci. 22: 1693*

63) Iadecola C, Zhang F (1996)
Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovaskular responses to hypercapnia and acethylcholine. *Am J Physiol 271: R990-R1001*

64) Iadecola C (1997)
Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci. 20: 132-139*

65) Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997)
Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficit in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci 17(23): 9157- 9164*

66) Jones SC, Bose B, Furian AJ, Friel HT, Easley KA, Meredith MP, Little JR (1989)

CO2 reactivity and heterogenity of cerebral blood flow in ischemic, border zone, and normal cortex. *Am J Physiol 257: H473-H482*

67) Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR (1993)
Nitric oxide production during local cerebral ischemia in rats. *Stroke 24: 1709-1716*

68) Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1988)
Endothelium-dependent constractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke 19: 476-479*

69) Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H (1999)
Ischemic core and Penumbra in human stroke. *Stroke 30: 93-99*

70) Koizumi J, Nakazawa T, Yoshida Y (1985)
Reperfusable brain infarction model in the rat (abstract). *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society, Kyoto, Japan, April 18-19, 1985, p 159*

71) Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991)
Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acand Sci USA 88: 4651-4655*

72) Kuluz JW, Prado R, Dietrich WD, Schleien CL, Watson BD (1993)
The effect of nitric oxide synthse inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. *Stroke 24: 2023-*2029

73) Kuschinsky W, Wahl M (1978)
Local chemical and neurogenic regulation of cerebral vascular resistence. *Physiol Rev 58: 656-689*

74) Kumura E, Kosaka H, Shiga T, Yoshimine T, Hayakawa T (1994)
Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab 14: 487-491*

75) Kvietys PR, Shepherd AP, Granger DN (1985)
Laser-Doppler, H2 clearance and microsphere estimates of mucosal blood flow. *Am J Physiol. 249; G221-7*

76) Laas R, Igloffstein J, Meyerhoff (1983)
Cerebral infarction due to carotid occlusion and carbon monoxide exposure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 46; 756-773*

77) Lamontagne D, Pohl U, Busse R (1992)
Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intakt rabbit coronary vascular bed. *Cir Res. 70: 123-130*

78) Leker RR, Shohami E, Abramsky O, Ovadia H (1999)
Dexanabinol; a novel neuroprotective drug in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurol Sci 1999 Jan 15; 162(2): 114- 119*

79) Loihl AK, Asensio V, Campbell IL, Murphy S (1999)
Expression of nitric oxide synthase (NOS)-2 following permanent focal ischemia and the role of nitric oxide in infarct generation in male, female and NOS-2 gene-deficient mice. *Brain Res 1999 May 29; 830(1): 155- 164*

80) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989)
Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke 20: 84-91*

81) MacKenzie ET, Scatton B (1987)
Cerebral circulatory and metabolic effects of perivascular neurotransmitters. *Crit Rev Clin Neurobiol 2: 357-419*

82) Malinsky T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M (1993)
Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab 13: 355-358*

83) Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993)
Structure and chromomsomal location of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem. 268: 17478-17488*

84) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991)
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev. 43: 109-142*

85) Moncada S (1992)
The 1991 Ulf von Euler lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand 145: 201-227*

86) Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA (1992a)
L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am J Physiol 263: H1632-H1635*

87) Morikawa E, Rosenblatt S, Moskowitz MA (1992b)
L-arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol 107: 905-907*

88) Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, Yoshida T, Irikura K, Dalkara T (1994)
L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke 25: 429-435*

89) Myatt L, Brockman DE, Eis A, Pollock JS (1993)
Immunohistochemical localisation of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta 14: 487-495*

90) Nagafuji T, Suzuki M, Hosoi Y (1998)
Lack of evidense that inducible nitric oxide synthase participates in the development of ischemic brain damage. *Nippon Yakurigaku zasshi 111(1): 45- 53*

91) Nagayama M, Zhang F, Iadecola C (1998)
Delayed treatment with aminoguanidine decreases focal cerebral ischemic damage and enhances neurologic recovery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab 18(10): 1107-1113*

92) Nagayama M, Aber T, Nagayama T, Ross ME, Iadecola C (1999)
Age-dependent increase in ischemic brain injury in wild-type mice and in mice lacking in the inducible nitric oxide synthase gene. *J Cereb Blood Flow Metab 1999 Jun; 19(6): 661- 666*

93) Nakane M, Mitchell J, Förstermann U, Murad F (1991)
Phosphorylation by calmdulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun. 180: 1396-1402*

94) Nathan C, Xie QW (1994)
Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controlls. *Cell 78: 915-918*

95) Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA, (1992)
Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol 263: H1356-H1362*

96) Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery Sp, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992)
Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest. 90: 2092-2096*

97) Ohta K, Graf R, Rosner G, Kumura E, Heiss WD (1996)
Early nitric oxide increase in depolarized tissue of cat focal cerebral ischaemia. *Neuroreport Vol8 No 1: 143-148*

98) Palmer RMJ, Asthon DS, Moncada S (1988)
Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature Lond. 333: 664-666*

99) Panahian N, Yoshida T, Huang PL, Hedley-Whyte ET, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1996)
Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience 72: 343-354*

100) Parmentier S, Bohme GA, Lerouet D, Damour D, Stutzmann JM, Margaill I, Plotkine M (1999)
Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischemic brain injury. *Br J Pharmacol 1999 May; 127(2): 546- 552*

101) Parsons AA, Schillin L, Wahl M (1991a)
Analysis of acetylcholin-induced relaxtion of rabbit isolated middle cerebral artery: effects of inhibitors of nitric oxide synthesis, Na, K-ATPase, and ATP-sensitive K-channels. *J Cerebr Blood Flow Metab 11: 700-704*

102) Parson AA, Wang Q, Schilling L, Lassen NA, Wahl M (1991b)
Effects of N-nitro-L-arginine (NOLAG) on rat pial arterioles in situ. *Plügers Arch Eur J Physiol 419 (Suppl 1): R112*

103) Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F (1991)
Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultered and native bovine aortic endothelia cells. *Proc Natl Acad Sci USA 88: 10480-10484*

104) Pollock JS, Nakane M, Buttery LK, Martinez A, Springgall D, Polak JM, Förstermann U, Murad F (1993)
Characterisation and localisation of endothelial nitric oxide synthase using spezific monoclonal antibodies. *Am J Physiol. 265: C1379-C1387*

105) Prado R, Watson BD, Zhao W, Yao H, Busto R, Dietrich WD, Ginsberg MD (1996)

L-arginine does not improve cortical perfusion or histopathological outcome in spontaneously hypertensive rats subjected to distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab 16: 612-622*

106) Radi R, Rodriques M, Castro L, Telleri R (1994)
Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys 308: 89-95*

107) Raichle ME, Hartmann BK, Eichling JO, Sharpe LG (1975)
Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA 72: 3726-3730*

108) Reivich M (1964)
Arterial P_{CO2} and cerebral hemodynamics. *Am J Physiol 206: 25-35*

109) Reivich M, Greenberg JH, Hamada J, Croul S, Kovach AGB, Dawson TM (1997)
Protective effect of neuronal NOS on focal cerebral ischemia in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis. 1997*

110) Reutens DC, McHugh MD, Toussaint PJ, Evans AC, Gjedde A, Meyer E, Stewart DJ (1996)
L-Arginine infusion increases basal but not activated cerebral blood flow in humans. *J Cerebr Blood Flow Metab 17: 309-315*

111) Riedel MW, Anneser F, Haberl RL (1995)
Different mechanisms of L-arginine induced dilation of brain arterioles in normotensive and hypertensive rats. *Brain Res. 671:21-26*

112) Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994)
Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem 269: 26066-26075*

113) Sadoshima S, Nagao T, Okada Y, Fujii K, Ibayashi S, Fujishima M (1997)
L-Arginine ameliorates recirculation and metabolic dereangement in brain ischemia in hypertensive rats. *Brain Res 744: 246-252*

114) Sakas DE, Moskowitz MA, Wie EP, Kontos HA, Kano M, Ogilvy CS (1989)
Trigeminovascular fibers increase blood flow in cortical gray matter by axon reflex-like mechanisms during acute severe hypertension or seizures. *Proc Natl Acad Sci USA 86: 1401-1405*

115) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL 1997
Nitric Oxide Synthase in Models of focal ischemia. *Stroke 28: 1283-1288*

116) Sato M, Pawlik G, Heiss W-D (1984)
Comparative studies of regional CNS blood flow autoregulation and responses to CO_2 in the cat. *Stroke 15: 91-97*

117) Schilling L, Wahl M (1993)
Histaminergic effects on cerebral hemodynamics*. In: Phillis JW (ed) The regulation of cerebral blood flow. CRC Press, Boca Raton, pp 113-28*

118) Schini VB, Vanhoutte PM (1991)

L-arginine evokes both endothelium-dependent end endothelium-independent relaxations in L-arginine depleted aortas of the rat. *Circ Res 68: 209-216*

119) Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F (1992)
Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem. 40: 1439-1456*

120) Schreiber SJ, Megow D, Raupach A, Victorov IV, Dirnagl U (1995)
Age-related changes of oxygen free radical production in the rat brain slice after hypoxia: on-line measurement using enhanced chemiluminescence. *Brain Res 703: 227-230*

121) Seylaz J, Hara H, Pinard E, Mraovitch S, MacKenzie ET, Edvinsson L (1988)
Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab 8: 875-878*

122) Smits GJ, Roman RJ, Lombard JH (1986)
Evaluation of laser-Doppler flowmetry a measure of tissue blood flow. *J Appl Physiol. 61 (2): 666-72*

123) Sugimura T, Sako K, Tohyama Y, Yonemasu Y (1998)
Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. *Brain Res 808:313-316*

124) Szabo C (1996)
Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull. Vol 41 No. 3pp: 131-141*

125) Toda N, Okamura T (1991)
Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation. *J Pharmacol Exp Ther 258: 1027-1034*

126) Touho H, Karasawa J (1996)
Evaluation of time-dependent thresholds of cerebral blood flow and transit time during the acute stage of cerebral embolism: a retrospective study. *Surg Neurol. 46: 135-145*

127) Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Förstermann U (1994)
Identification of a type III (endothelial-like) particulate nitric oxide synthase in LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol. 266: C22-C28*

128) Unterberg A, Schmidt W, Wahl M, Ellis EF, Marmarou A, Baethmann A (1991)
Evidence against leukotrienes as mediators of brain edema. *J Neurosurg 74: 773-780*

129) Unterberg A, Wahl M (1992)
Regulation of cerebral blood flow: a brief review. *In: Schmiedek P, et al (eds) Stimulated cerebral blood flow. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 3-11*

130) Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992)
Accumulation of an endogeneous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet 339: 572-575*

131) Wahl M, Schilling L (1993)
Regulation of cerebral blood flow-A brief review. *Acta Neurochir Suppl 59: 3-10*

132) Wang Q, Pelligrino DA, Paulson OB, Lassen NA (1994)
Comparison of the effects of N-Ω-nitro-L-arginine and indomethacin on the hypercapnic cerebral blood flow increase in rats. *Brain Res 641: 257-264*

133) Wester P, Dietrich WD, Prado R, Watson BD, Globus MYT (1992)
Serotonin release into plasma following common carotid artery thrombosis. *Stroke 23: 870-875*

134) White MF (1985)
The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochem Biophys Acta. 822:355-374*

135) Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Munford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992)
Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science 256: 225-228*

136) Xu W, Charles I, Moncada S, Gorman P, Liu L, Emson P (1993)
Chromosomal assignment of the inducible NOS gene and endothelial NOS gene to human chromosom 17p11→17q11 and chromosom 7, respectively. *Endothelium (Suppl). 1: S24. Abstract.*

137) Yamamoto S, Golanov EV, Berger SB, Reis DJ (1992)
Inhibition of nitric oxide synthesis increases ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow Metab 12: 717-726*

138) Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C (1991)
Purification of nitric oxide synthase from rat makrophages. *J Biol Chem. 266: 12544-12547*

139) Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Förstermann U (1993)
Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after cerebral ischemia in rats. *Stroke 24: 206-2022*

140) Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Förstermann U (1993)
Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after cerebral ischemia in rats. *Stroke 24: 206-2022*

141) Zhang ZG, Chopp M, Bailey F, Malinsky T (1994)
Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci 128: 22-27*

142) Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C (1996)
Aminoguanidin ameliorates and L-ardinine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke 27: 317-323*

143) Zhang F, Iadecola (1998)
Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage. *Brain Res 802(1-2): 104- 110*

7. Danksagungen

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

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Roman L. Haberl für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit in seinem damaligen Neurovaskulärem Labor an der Neurologischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximillians-Universität München durchzuführen und für die exzellente Betreuung und Motivation, die ich in all den Jahren hinweg von ihm erhalten habe. Desweiteren bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Bernd Sporer und bei Herrn PD Dr. med. Dr. med. habil. Uwe Ködel für die hervorragende Betreuung, die hilfreiche Unterstützung, die mir jederzeit und uneingeschränkt zur Verfügung stand und die wertvollen Anregungen.

Ganz besonderen Dank schulde ich meiner Familie, meinem Vater Herrn Dipl. Ing. Klaus W. Martens, dem diese Arbeit gewidmet ist, meiner Mutter Frau Helga Inge Martens und meiner Schwester Frau RA E. Dominique Martens-Thoma.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Frau, Frau Dr. med. Christina Martens-Rogall.

8. Lebenslauf

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