Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München Vorstand: Prof. Dr. M. Sperandio

> Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie

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

> vorgelegt von Jens Eckhoff aus Itzehoe 2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Alexander Baethmann
Mitberichterstatter:	1. Prof. Dr. med. Christian Opherk
	2. Prof. Dr. med. Andreas Unterberg
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	10.02.2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite
	1.1. Vorwort	8
	1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	10
	1.3. Aktivierung von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie	11
	1.4. Stand der Forschung	13
	1.5. Ziel der Studie	14
2.	Material und Methoden	
	2.1. Versuchstiere und Haltung	15
	2.2. Experimentelles Modell	
	2.2.1. Narkose	15
	2.2.2. Temperatur	16
	2.2.3. Arterieller und venöser Katheter	16
	2.2.4. Umschlingen der Halsschlagader	17
	2.2.5. Transdurales Schädelfenster	17
	2.3. Laser-Doppler-Fluxmetrie	18
	2.4. Intravitalmikroskopie	
	2.4.1. Epiillumination	19
	2.4.2. Intravitalmikroskop	20
	2.4.3. Fluoreszenzfarbstoffe	22
	2.4.4. Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser	23
	2.4.5. Leukozyten – Endothelinteraktionen	24
	2.4.6. Kapillardichte	24
	2.4.7. Integrität der Blut-Hirnschranke	25
	2.5. Körpergewicht	25
	2.6. Neurologische Untersuchung	25
	2.7. Histologie	26
	2.7.1. Infarktausmessung	27

2.8. Versuchsgruppen und Protokolle

2.8.1.	Versuchsgruppe ,Systemische Parameter'	27
2.8.2.	Versuchsgruppe, Frühe Reperfusion'	28
2.8.3.	Versuchsgruppe, Frühe Reperfusion'	
	und unterschiedliche Ischämietiefe	29
2.8.4.	Versuchsgruppe ,Späte Reperfusion'	31

32

2.9. Statistik

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollparameter	
3.1.1. Systemische Parameter	33
3.1.2. Makrohämodynamik – Mittlerer arterieller Blutdruck	
Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion'	34
3.1.3. Makrohämodynamik – Mittlerer arterieller Blutdruck	
Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion'	
und unterschiedliche Ischämietiefen	35
3.2. Zielparameter – Versuchsgruppe, Frühe Reperfusion'	
3.2.1. Arterielle Gefäßdurchmesser	36
3.2.2. Venöse Gefäßdurchmesser	37
3.2.3. Laser-Doppler-Fluxmetrie	38
3.2.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen - Roller venös/arteriell	40
3.2.5. Leukozyten-Endothelinteraktion – Sticker venös/arteriell	41
3.2.6. Kapillardichte	43
3.2.7. Plugger Kapillargebiet	45
3.2.8. Sticker Kapillargebiet	46
3.2.9. Perfundierte Venolen Kapillargebiet	46
3.2.10. Blut-Hirnschranke	48
3.2.11. Neuroscore	48
3.2.12. Körpergewicht	49
3.2.13. Infarktvolumen	50
3.2.14. Korrelationsgraph Laser-Doppler-Fluxmetrie gegenüber Infarkt	52
3.2.15. Überleben	52

3.3. Zielparameter – Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion' und	unterschiedliche
Ischämietiefen	
3.3.1. Arterielle Gefäßdurchmesser	53
3.3.2. Venöse Gefäßdurchmesser	54
3.3.3. Laser-Doppler-Fluxmetrie	55
3.3.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen - Roller venös/arteriell	57
3.3.5. Leukozyten-Endothelinteraktionen - Sticker venös/arteriell	60
3.3.6. Kapillardichte	61
3.3.7. Plugger Kapillargebiet	64
3.3.8. Sticker Kapillargebiet	65
3.3.9. Perfundierte Venolen Kapillargebiet	65
3.3.10. Blut-Hirnschranke	67
3.3.11. Neuroscore	67
3.3.12. Körpergewicht	68
3.3.13. Infarktvolumen	70
3.3.14. Überleben	71
3.4. Zielparameter – Versuchsgruppe ,Späte Reperfusion'	
3.4.1. Arterielle Gefäßdurchmesser	73
3.4.2. Venöse Gefäßdurchmesser	74
3.4.3. Leukozyten–Endothelinteraktionen – Roller venös	75
3.4.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Sticker venös	76
3.4.5. Kapillardichte	77
3.4.6. Perfundierte Venolen Kapillargebiet	78

4. Diskussion

4.1. Methodik	
4.1.1. Das experimentelle Modell	79
4.1.2. Versuchstiere	80
4.1.3. Dauer der Ischämie	83
4.1.4. Intravitalmikroskopie der zerebralen Mikrozirkulation	83
4.1.5. Quantifizierung der zerebralen Durchblutung	86
4.1.6. Neurologische Untersuchung und Histologie	86

4.2. Ergebnisse

	4.2.1.	Kontrollparameter	87
	4.2.2.	Zerebrale Durchblutung	88
	4.2.3.	Neuroscore und Infarktgröße	91
	4.2.4.	Leukozyten und sekundärer Hirnschaden	91
5.	Zusamme	nfassung und Aussicht	96
6.	Literaturv	erzeichnis	98

7. Danksagung 105

8.	Lebenslauf	106

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Der Begriff Ischämie bedeutet eine Minderdurchblutung oder ein vollständiger Ausfall der Durchblutung eines Gewebes oder eines Organs. Je nach Ausmaß der Ischämie kommt es zu Störungen der Funktion, des Metabolismus und letztlich der anatomischen Struktur [40]. Eine Ischämie im Gehirn des Menschen hat, aufgrund der hohen Durchblutung und der großen Stoffwechselleistung des Gehirns, hier besondere Bedeutung.

Grundsätzlich wird zwischen einer globalen und einer fokalen Form der zerebralen Ischämie unterschieden [95]. Im Fall einer globalen Ischämie des Gehirns liegt eine Durchblutungsabnahme vor, die den Großteil des gesamten Gehirns betrifft. Ursachen hierfür können ein plötzlicher Herz-Kreislaufstillstand, z.B. nach einem Herzinfarkt, eine arterielle Hypotension, z.B. aufgrund von Herzrhythmusstörungen oder ein starker Blutverlust im Rahmen eins Polytraumas sein.

Dagegen liegt bei der fokalen zerebralen Ischämie eine Abnahme der Durchblutung nur in einem bestimmten Bereich des Gehirns vor, z.B. im Versorgungsgebiet einer intrakraniellen Arterie. Die Ursachen hierfür liegen hauptsächlich in Stenosierungen oder einem kompletten Verschluss einzelner Hirnarterien aufgrund von mikro- oder makroangiopathischen Veränderungen, durch Embolien aus zuführenden Gefäßen oder dem Herzen. Aber auch Thrombosierungen oder Abflussstörungen in venösen Hirnvenen durch einen Tumor oder durch eine posttraumatische Hirnschwellung können einen ischämischen Infarkt auslösen [69]. Dieser fokale Durchblutungsabfall liegt dem Schlaganfall, oder Apoplex cerebri, ursächlich zugrunde.

Der Schlaganfall ist definiert als ein neurologisches Defizit bedingt durch eine akute fokale Störung des zentralen Nervensystems aufgrund einer vaskulären Ursache [91]. Je nach Ätiologie unterscheidet man zwischen einem, durch eine umschriebene Durchblutungsstörung des Gehirns bedingten, ischämischen Schlaganfall (ca. 80-85% der Fälle) oder einem, durch eine intrakranielle Blutung ausgelösten, hämorrhagischen Schlaganfall (ca. 15-20 % der Fälle). Davon abzugrenzen ist die TIA, die sogenannte transitorisch ischämische Attacke, die nach neueren Richtlinien definiert wird als eine kurze Episode einer neurologischen Störung aufgrund einer fokalen zerebralen Ischämie. Im Gegensatz zum Schlaganfall kommt es hierbei allerdings nicht zu einer anhaltenden zerebralen Infarzierung [34]. Da der Schlaganfall eine komplexe Erkrankung darstellt, die verschiedene Ursachen haben kann, wurden bereits vor einigen Jahrzehnten verschiedene Einteilungen des Schlaganfalls vorgestellt. Hierbei war das Ziel, für den jeweiligen Schlaganfalltyp die richtige Therapie und eine Vorhersage für das zukünftige Risiko eines erneuten Schlaganfalls zu finden. So wurde unter anderem 1993 die TOAST-Klassifikation (Trial of Org in acute stroke treatment) vorgestellt, um den Erfolg einer bestimmten Antikoagulationstherapie für verschiedene Schlaganfalltypen aufzuzeigen. Zwar stellte sich heraus, dass das eingesetzte Antikoagulanz keinen Effekt für die verschiedenen Schlaganfalltypen hatte, die Klassifikation wurde aber für verschiedene andere Zwecke, wie zum Beispiel das Ermitteln von Risikofaktoren oder genetischen Merkmalen weiterhin verwendet. Im Jahr 2003 wurde das CCS (Causative Classification System) vorgestellt, um eine evidenzbasierte Ursachenklassifikation des Schlaganfalls unter Einbeziehung verschiedener neuerer Untersuchungstechniken, wie zum Bespiel der diffusionsgewichteten Kernspintomographie, zu etablieren. Dabei erfolgte auch hier die Einteilung in 5 Gruppen mit Unterteilung in verschiedene Untergruppen, wie bei der TOAST-Klassifikation [21]. 2011 wurde von Gao et al. die CISS-Klassifikation (Chinese Ischemic Stroke Classifikation) mit dem Ziel einer noch genaueren Unterteilung eines Schlaganfalls, initiiert. Diese Einteilung besteht aus 2 Teilen. Zuerst wird der Schlaganfall, basierend auf der TOAST-Klassifikation, in 5 Gruppen unterteilt. Im zweiten Teil erfolgte die Eingruppierung anhand des zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismus [36].

Die medizinische und auch wirtschaftliche Bedeutung des Schlaganfalls für eine Bevölkerung wird durch die von der American Heart Association im Jahr 2009 vorgestellten Zahlen für die amerikanische Bevölkerung verdeutlicht. Demnach ereignet sich in den USA im Durchschnitt alle 40 sec. ein Schlaganfall. Alle 4 Minuten verstirbt ein Schlaganfallpatient. Da die Gesellschaft immer älter wird, wird die Anzahl an Schlaganfällen wahrscheinlich steigen. Bei allen Überlebenden eines Schlaganfalls kommt es in 70% der Fälle zu einer verminderten Arbeitsfähigkeit, 30% der Patienten brauchen Hilfe im Alltag. Für das Jahr 2010 wurden in den USA die geschätzten Gesundheitskosten für Schlaganfallpatienten auf ca. 74 Milliarden Dollar geschätzt. Der Schlaganfall ist die zweithäufigste Todesursache weltweit [69].

Durch neue therapeutische Ansätze und Entwicklungen konnte der Anteil pflegebedürftiger Patienten nach einem Schlaganfall reduziert wird [12].

1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Kommt es zu einer fokalen zerebralen Ischämie, führt diese zu einem fast kompletten Ausfall der Durchblutung im Kern der Ischämie. In diesem umschriebenen Gebiet kommt es innerhalb von Minuten zum irreversiblen Zellsterben. Um diesen Kern herum nimmt die Durchblutung zwar auch ab, aber sie liegt noch oberhalb der Schwelle, die den Zelluntergang bedingt. Dieses Gebiet wird als Penumbra bezeichnet und sie enthält Gehirnzellen, die, bei Erholung der Durchblutung innerhalb einer bestimmten Zeit, ihre Funktion wiederaufnehmen können. Hier lag ein wesentlicher Therapieansatz der letzten Jahrzehnte [111].

Intrazellulär kommt es nach der Minderung der Hirndurchblutung aufgrund des weiter anhaltenden Verbrauchs von ATP zu einer Abnahme desselben und zur Ausbildung einer Laktatazidose. Dies führt zu einem Zusammenbruch der Ionenhämostase in den Nervenzellen. Im weiteren Verlauf werden Neurotransmitter freigesetzt sowie deren Wiederaufnahme verringert, vor allem Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischem Neurotransmitter. Dessen Bindung an verschiedene Rezeptoren lässt Calcium, Natrium und Wasser in die Zellen fließen. Der intrazellular erhöhte Calciumspiegel aktiviert unter anderem Phospholipase und Proteasen [67], was zu Zerstörung von Nervenzellmembranen führt, wohingegen der gleichzeitig stattfindende Natrium- und Wassereinstrom zu Zellschwellung, Ödem und Abnahme des Extrazellulärraums führt. Zusätzlich führen die oben genannten Veränderungen zu einer Aktivierung der mitochondrialen Bildung von Sauerstoffradikalen und Prostaglandinen. [70]. Neben diesen werden weitere Prozesse angestoßen, wie zum Beispiel die Lipooxygenasekaskade [82], die Aktivierung von PARP [62], um nur Einige zu nennen. Sie führen zu Nekrose, Zelltod und Zellabbau [86].

Auch der negative Einfluss von sogenannten 'cortical spreading depression' (CSD), also eine starke Depolarisierung von Neuronen während einer zerebralen Ischämie, führt zu einer Infarktvergrößerung [78].

Diese oben genannten Prozesse führen schließlich zu einer Aktivierung des Immunsystems und dem Auftreten von Entzündungszellen [51] [71].

Kommt es im Verlauf zu einer Erholung der Durchblutung, so ist dies zwar überlebenswichtig für die Gehirnzellen, die noch nicht abgestorben sind. Allerdings führt die Reperfusion auch zum sog. 'secondary brain injury', und somit zu einem zusätzlichen Schaden im Gehirn.

Bereits 1993 konnten Banati et al [4] zeigen, dass aktivierte Mikroglia, also die ortsständigen Immunzellen des ZNS, sich in der Nähe der Läsion sowie der Penumbra ansammelt. Dabei stellte sich in neuerer Zeit heraus, dass diese Immunzellen nicht nur negativen Einfluss auf das ZNS haben, sondern sowohl modulierend als auch schützend auf entzündliche Prozesse im ZNS einwirken können [74] [100].

1.3. Aktivierung von Leukozyten bei der zerebralen Ischämie

Barone et al. zeigten 1992 in Versuchen an Ratten, dass sich bei der fokalen zerebralen Ischämie neutrophile Granulozyten sowohl innerhalb als auch außerhalb von Venolen im Gehirn anreicherten [7]. Clarke et al. zeigten 1994, dass polymorphkernige Leukozyten in einem Zeitraum von Minuten bis zu einigen Stunden im Gehirngewebe auftraten [23].

Neben diesen Feststellungen ist heutzutage allgemein anerkannt, dass die Ischämie eine lokale Entzündungsreaktion im betroffenen Gehirngebiet induziert und diese wiederum zu einer Aktivierung von verschiedenen Zellarten führt. Am Ende einer Kaskade kommt es, neben einer gesteigerten Produktion von Sauerstoffradikalen und einer gestörten Bluthirnschrankenfunktion, zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und zu einem Verschluss von Kapillaren durch Leukozyten. Diese Prozesse bedingen die Entstehung und Entwicklung eines Infarktes [114].

Die oben erwähnten Adhäsionsmoleküle fördern das Rollen und Sticken von Leukozyten am Gefäßendothel bei Ischämie/Reperfusion. Das Adhäsionsmolekül P- Selectin ist hierbei für das Leukozytenrollen verantwortlich, während das feste Anheften von Leukozyten, das sogenannte ,Sticken', am Gefäßendothel durch Beta-2-Integrine vermittelt wird [52].

Danton et al. vertraten die These, dass es nach dem festen Anheften der Leukozyten zu einem Auswandern dieser in das umliegende ischämische Hirngewebe kommt und sie dort mit Astrozyten und der ortsständigen Mikroglia reagieren [26].

Sowohl Astrozyten als auch die Mikroglia werden durch eine Ischämie aktiviert und bilden entzündungsfördernde Zytokine, die wiederum zur einer weiteren Leukozytenrekrutierung und Expression von Adhäsionsmolekülen führen. Weiterhin wird vermutet, dass es dann zu einer Reaktion der Astrozyten mit den ins Hirngewebe eingewanderten Leukozyten kommt und die wiederum zu einer Freisetzung von Zytokinen führt, unter anderem II-1, TNF α und MCP-1 [2]. Beck et al. konnte an einem Model der globalen zerebralen Ischämie in der frühen Reperfusion einen signifikanten Anstieg rollender, als auch fest am Gefäßendothel von postkapillären Venolen anheftender Leukozyten intravitalmikroskopisch feststellen [8].

Eine Arbeit von Beray-Berthat et al. aus dem Jahr 2003 konnte an einem Rattenmodell und 2stündiger fokaler zerebraler Ischämie eine Reduktion des postischämischen Schadens im ipsilateralen Cortex nach Gabe von Vinblastin zeigen, woraus geschlossen wurde, dass Leukozyten am postischämischen Hirnschaden großen Anteil haben [11].

Lehmberg et al. zeigte 2006 in seiner Arbeit, dass ein P-Selectin-Antikörper zwar das Rollen der Leukozyten am Gefäßendothel nach globaler zerebraler Ischämie reduzierte, aber weder einen Effekt auf das feste Anheften von Leukozyten am Gefäßendothel noch auf das Überleben der Tiere im Verlauf hatte [64].

Die Arbeitsgruppe um Jin et al. schlussfolgerte aus seinen Untersuchungen, dass P-Selectin-Expression zur Störung der Blut-Hirnschranke 24 Stunden nach transienter fokaler zerebraler Ischämie beiträgt [54].

Durch intravitalmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen konnten Hermann et al. vorweisen, dass Leukozyten im ischämischen Hirnareal akkumulieren und prädisponierend sind für den sekundären Hirnschaden, ein Hirnödem und ein schlechteres neurologisches Outcome [50].

Die auf diesen oben genannten Überlegungen basierenden und in Tierexperimenten teilweise erfolgreich angewandten Therapien, konnten in der klinischen Anwendung am Menschen allerdings bisher nicht überzeugen

Eine Arbeit von Enzmann et al. aus dem Jahr 2013 zeigte sogar, dass es in der frühen Phase der Ischämie gar nicht zu einem Auswandern der Leukozyten in das geschädigte Hirngewebe kommt, sondern das die Hirngefäße im infarzierten Gebiet der Ort sind, an dem Leukozyten aktiv sind [35].

Aus den oben genannten experimentellen Ergebnissen von Beck et al. und Lehmberg et al. sowie den doch unterschiedlichen Ergebnissen und Schlussfolgerungen der aktuellen Forschung war dieses Projekt bezüglich Material und Methoden, Versuchsmodel und Ablauf eine logische Folgerung.

1.4. Stand der Forschung

Bereits im Jahr 1968 beschrieben Ames und Mitarbeiter erstmals, dass die Ischämie die Eigenschaften von Blut verändert und dadurch die Rezirkulation bei der globalen Ischämie beeinträchtigt [1]. Der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten wird dabei eine besondere Rolle zugeschrieben [27]. Hallenbeck [46] und del Zoppo [28] haben eine Häufung von weißen Blutkörperchen im ischämischen Hirngewebe gefunden mit Verschluß von Mikrogefäßen durch diese Zellen. Neben dem Eindringen dieser Blutkörperchen [37] [38] ist es regelhaft beobachtet und bestätigt worden, dass eine Unterbindung dieses Vorganges, u. a. durch Anti-Leukozytenserum [10] oder Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle [14] [20] [101] [96] bei der zerebralen Ischämie protektiv ist, ebenso durch die Verwendung genetisch veränderter Mäuse mit eingeschränkter Leukozytenfunktion [24] [85].

Es gibt zahlreiche Untersuchungen die gezeigt haben, dass es zu einer Aktivierung von Leukozyten während der fokalen zerebralen Ischämie kommt [49].

Die unterschiedlichen Ergebnisse auf diesem Forschungsgebiet lassen sich nicht immer vergleichen, da sowohl die Versuchsanordnung, als auch die Tierspezies selten gleich sind.

Die Hypothese, dass Leukozyten als Mediatoren des zerebralen Sekundärschadens fungieren können erfordert ihre Aktivierung und Akkumulation bei Ischämie und Reperfusion, sowie eine Abhängigkeit der Gewebeschädigung vom Ausmaß der Leukozytenaktivierung.

1.5. Ziel der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Leukozyten-Endothelinteraktionen in der Pathophysiologie der transienten fokalen zerebralen Ischämie zu untersuchen. Hierfür war zunächst notwendig:

 Etablierung eines akuten und chronischen experimentellen Modells zur Analyse der Mikrozirkulation unter besonderer Berücksichtigung von Leukozyten-Endothelinteraktionen und Klärung von Ausmaß und Kinetik der auftretenden Phänomene.

Die Auswirkungen der Leukozytenaktivierungen sollte dann anhand der folgenden Untersuchungen erfasst werden:

- 2. Quantifizierung des Gewebeschadens nach transienter fokaler zerebraler Ischämie anhand histologischer Untersuchungen in den betroffenen Hirnarealen.
- 3. Ermittlung des funktionellen Outcomes der Versuchstiere durch Untersuchung auf neurologische Defizite, Gewichtsverlust und Verhaltensauffälligkeiten.
- 4. Beurteilung der Ischämietiefe in Bezug auf das neurologische Defizit, die Infarktgröße und die Leukozyten-Endothelinteraktionen.

Als zentraler Teil der Methodik wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Dieses Verfahren ermöglicht die direkte Darstellung der mikrovaskulären Durchblutung und die quantitative Beurteilung von zellulären Interaktionen und Veränderungen des Gefäßbettes in verschiedenen Organen.

Durch das Überleben der Tiere nach der Akutphase des Versuches konnten die Tiere noch über 4 Tage neurologisch untersucht werden und anschließend der histologische Gewebeschaden analysiert werden. Eine weitere Versuchsreihe mit Durchführung der Intravitalmikroskopie 12 – 96 Stunden nach Ende einer 2-stündigen transienten fokalen zerebralen Ischämie konnte auftretende Leukozyten-Endothelinteraktionen zu einem deutlich späteren Untersuchungszeitpunkt gegenüber der ersten Versuchsreihe darstellen.

2. Material und Methoden

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit erfolgten in den Jahren von 1999 bis 2001 am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Drs h.c. mult. K. Meßmer).

Der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau erfolgte an dem bereits von Beck et al. beschriebenen und etablierten Versuchsaufbau zur Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der globalen Ischämie [8].

2.1. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden Mongolische Wüstenrennmäuse (Meriones unguiculatus), auch als Gerbil bezeichnet, männlichen Geschlechts, einem Alter zwischen 3-6 Monaten und einem Körpergewicht von 60 – 80g verwendet.

Die Haltung erfolgte im institutseigenen Tierstall. Dort wurden die Wüstenrennmäuse in Macrolonkäfigen vom Typ 3 bei einer Raumtemperatur von 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem kunstlichtgesteuerten 12-stündigen Tag-/ Nachtzyklus gehalten. Nach Abschluss des Akutversuches wurden die Tiere zur postoperativen Beobachtung jeweils einzeln in einem Käfig untergebracht. Die frei zugängliche Nahrung bestand aus Trockenfutter (Fa. Ssniff Spezialdiäten, Soest, mit 18.000 I.E./kg Vit. A, 1280 I.E./kg Vit. D3 und 120mg/kg Vit. E) und Trinkwasser je nach Bedarf der Tiere.

2.2. Experimentelles Modell

2.2.1. Narkose

Die Narkose erfolgte während des gesamten Versuches mit dem Inhalationsanästhetikum Halothan (Halothan Hoechst®, Hoechst AG, Frankfurt am Main), welches stark narkotisch und gering analgetisch wirkt. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere unter eine Plexiglashaube gelegt, in die ein Gasgemisch aus Luft, angereichert mit Sauerstoff auf 25% Volumenanteil und Halothan 4% Volumenanteil, eingeleitet wurde. Mit Hilfe eines Oxymeters (Oxidig, Drägerwerke AG, Lübeck) wurde die inspiratorische Sauerstofffraktion kontinuierlich gemessen. Für die gesamte Versuchsdauer erhielten die spontanatmenden Tiere eine Maskennarkose über einen zurechtgeschnittenen Spritzenkopf einer 20ml Spritze (20ml

Spritze, Braun Melsungen AG, Melsungen), der über die Schnauze der Tiere gesetzt wurde. Das Gasgemisch mit einem Volumenanteil von 0,4% bis 1,5% Halothan und einem konstanten Fluss von 0,5 l/min, wurde über einen Gummischlauch, der in den Spritzenkopf eingelassen war, den Tieren zur Einatmung angeboten. Zur Absaugung der Narkosegase diente ein zweiter, ebenfalls in den Spritzenkopf eingelassener Gummischlauch. Der im Einatmungsgemisch enthaltene Volumenanteil Halothan wurde für jedes Tier zu dem jeweiligen Versuchszeitpunkt individuell eingestellt, um einen konstanten mittleren arteriellen Blutdruck aufrecht zu erhalten.

2.2.2. Temperatur

Um eine konstante Körpertemperatur während der Präparations- und Versuchsdauer zu erhalten, wurden die Tiere auf eine auf 37°C erwärmte Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing) gelegt. Diese war mit einer rektal eingeführten Temperatursonde (Fa. Effenberger, Pfaffing) rückgekoppelt, um ein Auskühlen oder Überwärmen der Tiere zu vermeiden. Die parietale Schädelkalotte wurde mit einer ebenfalls 37°C warmen isotonen Kochsalzlösung superperfundiert, um eine lokale Hypothermie zu verhindern.

2.2.3. Arterieller und venöser Katheter

Die im Folgenden beschriebenen mikrochirurgischen Präparationen erfolgten mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Fa. Zeiss, Oberkochen). Für die kontinuierliche mittlere arterielle Blutdruckmessung, wurde den Gerbilen ein Kunststoffkatheter (Außendurchmesser 0,61 mm, Innendurchmesser von 0,28 mm) der Fa. Portex (Hythe, England) in die A. caudalis gelegt. Mittels Perfusorpumpe (Perfusor secura, Fa. B. Braun, Melsungen) wurde ein kontinuierlicher Fluß mit einer Rate von 0,2 ml/h einer isotonen Kochsalzlösung (Fa. Fresenius, Bad Homburg) aufrechterhalten. Er war über einen Druckschlauch, der mit Kochsalzlösung gefüllt war, an einem Druck-Transducer (DTX Plus, Fa. Spectramed, Düsseldorf) angeschlossen. Der Transducer war mit einem Messaufnahmesystem (Servomed SMS 308, Fa. Hellige GmbH, Freiburg im Breisgau) verbunden, das den aktuellen Blutdruck anzeigte.

Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe zu Beginn und während des Versuches wurde außerdem noch ein venöser Zugang in die linke V. femoralis gelegt. Hierfür wurde ebenfalls ein Kunststoffkatheter mit den gleichen Durchmessern der Fa. Portex (Hyte, England) verwendet.

2.2.4. Umschlingen der Halsschlagader

Zur Präparation der rechten Halsschlagader lag das narkotisierte Versuchstier auf dem Rücken. Der Hautschnitt an der rechten Halsseite wurde zwischen Unterkiefer und Manubrium sterni gesetzt. Es folgte die Mobilisierung der Glandula mandibula und des Fettgewebes. Die rechte Arteria carotis wurde dann im Winkel zwischen dem Musculus sternocleidomastoideus und sternohyoideus aufgesucht und im Verlauf entlang der Trachea dargestellt. Geachtet werden musste dabei auf den im Präparationsgebiet ebenfalls verlaufenden Truncus sympathicus und den Nervus phrenicus. Anschließend wurde die A. carotis mit einem monofilen Prolenefaden (Stärke 5-0, Fa. Ethicon, Norderstedt) vorsichtig umschlungen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass weder während, noch nach der erfolgreichen Umschlingung der Halsschlagader der Blutfluss in dieser Arterie unterbrochen wurde. An die freien Enden dieses Fadens wurde dann zur Induktion der Ischämie im späteren Versuchsablauf eine chirurgische Klemme mit einem Gewicht von ca. 15g angehängt.

Die Gerbilen weisen die anatomische Besonderheit eines insuffizienten Circulus arteriosus willisi auf [66]. Dadurch gibt es keine suffiziente Anastomose zwischen dem vorderen und dem hinteren gibt. Eine Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr in einer der beiden Halsschlagadern führt zu einer Reduktion des arteriellen Blutzuflusses auf der betroffenen Seite. Da aber eine Restdurchblutung über die Arteria communicans anterior zur betroffenen Seite möglich ist, ist die Minderdurchblutung und somit das Ausmaß der fokalen Ischämie nicht vorhersehbar. Nach Beendigung der zweistündigen Ischämiephase wurde die Reperfusion durch vorsichtiges Ziehen des Prolenefadens eingeleitet.

2.2.5. Transdurales Schädelfenster

Um nun mit der Präparation des Schädelfensters fortfahren zu können, wurde das Tier von der Rücken- in die Bauchlage gedreht und der Kopf des Tieres zur Stabilisierung des Schädels in den Stereotax (Mod. 51600, Stoelting Co., Wooddale, IL, USA) eingespannt, wobei die beiden Ohrstäbe auf den Meatus acusticus externus gesetzt wurden. Der mediale Hautschnitt über der parietalen Kalotte erfolgte über eine Länge von 2,5 cm. Die Hautränder wurden anschließend mit vier Seidenfäden (Perma-Hand Seide Stärke 4.0, Fa. Ethicon, Norderstedt) auseinandergehalten. Das Periost über dem rechten Knochen der Hemisphäre wurde sorgfältig entfernt. Mit Hilfe eines elektrobetriebenen Bohrers (Fa. Rewatronic, München), in dem ein Rosenbohrer (Durchmesser 0,75 mm, Fa. Fäger Sup-Dent, München) eingespannt wurde, erfolgte unter Vergrößerung durch ein Operationsmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen) das Fräsen eines ca. 4 x 4 mm großen Schädelfensters bis auf die Lamina interna des Schädelknochens unter regelmäßiger Kühlung mit 0,9% Kochsalzlösung. Anatomisch befand sich dieses Fenster ca. 2 mm lateral der Sutura sagittalis, sowie unterhalb der Sutura coronalis und oberhalb der Sutura lambdoidea. Das ausgefräste Schädelfenster wurde vorsichtig mit einer feinen Pinzette (Fa. Aesculap, Tuttlingen) herausgelöst. Wurde die Dura mater während des Bohrens oder beim Herauslösen des Knochens beschädigt, erfolgte der Ausschluss des Tieres. Das, aufgrund der intakten Dura mater auch als geschlossenes Schädelfenster bezeichnete Fenster, wurde in der nun folgenden Versuchszeit feucht gehalten, indem die vier Seidenfäden so über Widerlager gespannt wurden, dass der Hautschnitt sich zu einem kleinen Trichter aufspannte. Dieser wurde dann kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung, die auf 37°C erwärmt wurde, befüllt.



Abb. 1: Schema des transduralen Schädelfensters mit geschlossener Dura mater (aus Beck, et al.)

2.3. Laser-Doppler-Fluxmetrie

Zur kontinuierlichen Messung der kortikalen Durchblutung wählten wir die Laser-Doppler-Fluxmetrie [30] [31] [63]. Bei der Laser-Doppler-Fluxmetrie wird Infrarot-Licht von einer Laserdiode auf ein Gewebe abgegeben und wieder aufgenommen. Dabei wird dieses Licht von bewegenden Zellen und von nicht bewegendem Gewebe gestreut. Bei sich bewegenden Zellen kommt es aber, im Gegensatz zum ortsständigen Gewebe, dabei zu einem Doppler-Frequenzsprung.

Die Häufigkeit dieses Frequenzsprung ist proportional zur Geschwindigkeit der sich bewegenden Zellen [31].

Die an einem Mikromanipulator angebrachte Glasfasersonde sendete das Laserlicht auf die Dura mater. Das vom Gewebe zurückgesendete Streulicht erzeugte über den Fotodetektor ein elektrisches Signal.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Laser-Doppler-Messung zur Messung der kortikalen Durchblutung nach Haberl [44]

Das so entstandene Signal des Fotodetektors wurde von einem Analog- und Digitalprozessor weiterverarbeitet. Die gemessenen Werte, als willkürliche Einheit ohne Dimension, der Laser-Doppler-Fluxmetrie wurden sowohl zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten, als auch zwischendurch, notiert. Da das Laserlicht während der Messung zu einer Überstrahlung des Gewebes führte, war eine gleichzeitige Messung des LDF und Anfertigung intravitalmikroskopischer Bilder nicht möglich.

2.4. Intravitalmikroskopie

2.4.1. Epiillumination

Fluoreszenzlicht ist Licht, dass durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge erzeugt wird [44]. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz leuchtet Fluoreszenz nicht nach. Bei der Epiilluminationsmikroskopie (Abb. 3) wird ein fluoreszierender Indikator mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, dass durch eine Lichtquelle erzeugt wird und einen Filter passieren muss. Zur Beobachtung der Fluoreszenzemission sind Sperrfilter in den Strahlengang eingebracht, die das Licht des Anregungsspektrums absorbieren oder reflektieren. Im Okular

erscheint deshalb keine Erregungsstrahlung, während das Fluoreszenzlicht die Sperrfilter passiert. Durch die helle Emission des fluoreszierenden Indikators vor einem dunklen Hintergrund wird ein hoher Bildkontrast erreicht.



Abb. 3: Schema der Fluoreszenzmikroskopie mit Epiilluminationstechnik, nach Gerlach [45].

2.4.2. Intravitalmikroskop

Die Messung der Mikrozirkulation der Hirnoberfläche erfolgte, wie bereits von Beck et al. zur Untersuchung der Mikrozirkulation bei der globalen zerebralen Ischämie, mit einem Orthoplan Epiilluminationsmikroskops (Fa. Leitz, Wetzlar) [8]. Da sich der im Folgenden ausführlich beschriebene Versuchsaufbau bei Beck et al. für die globale zerebrale Ischämie bereits als sehr verlässlich und stabil bewiesen hatte, wurde der Aufbau für die Untersuchungen bei der fokalen zerebralen Ischämie unverändert übernommen [8].

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz war schwingungsfrei auf einer 300 kg schweren Granitplatte befestigt. Über ein Kugelgelenk (Fa. Effenberger, Pfaffingen) war der stereotaktische Halter mit dem Versuchstier fixiert, wodurch das Schädelfenster in der Horizontalen orientiert werden konnte. Pro Versuch wurden 3-4 Gefäßgebiete – *Regions of*

interest (ROI) - der Hirnoberfläche in einem x-y-Koordinatensystem festgelegt und mit Hilfe eines Kreuztisches (Fa. Leitz, München) exakt reproduzierbar wiedergefunden. Das schnelle Wiederfinden der gespeicherten ROIs zu den gewünschten Messzeitpunkten und somit die wiederholte Beobachtung identischer Gefäßabschnitte über den gesamten Versuchszeitraum wurde durch computergesteuerte Schrittmotoren (IXE.C, Fa. Phytron, Gröbenzell) gewährleistet. Als Anregungslichtquelle stand eine 75 W Xenon-Gasentladungslampe (XBO 75 W/2, Fa. Leitz, München) zur Verfügung bei einer Strahlungsleistung (in Prozent der Leistungsaufnahme) bei: $\lambda < 380$ nm von ca. 3 %, bei λ : 380 – 760 nm von ca. 15 % und bei $\lambda > 780$ nm von ca. 44 %. Das Licht passierte zunächst ein 7 mm Hitzefilter (Fa. Leitz, München), danach eine variable Irisblende, schließlich eine fest installierte Filterkombination. Die Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung Ploemopak (Fa. Leica, Wetzlar) ermöglichte dabei die Integration von aufeinander abgestimmten Erregerfilter, Reflexions-Kurzpassfilter und Sperrfilter in austauschbaren Filterblöcken. Durch eine schnelle Schaltvorrichtung (Fa. Leitz, Wetzlar) zwischen den Filterblöcken N2, L3 und I2/3 (Tab. 1) konnten die mit unterschiedlichen Fluoreszenzindikatoren gefärbten Strukturen per Mehrwellenfluoreszenztechnik unter raschem Bildwechsel separat dargestellt werden.

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

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

Das Salzwasserimmersionsobjektiv (25-fach, numerische Apertur: 0,6; Fa. Leitz, Wetzlar) konzentriert als Kondensor die Erregerstrahlung im Objektfeld und sammelt gleichzeitig das emittierte Fluoreszenzlicht. Ein 10-fach Objektiv mit der numerischen Apertur 0,22 erlaubte Übersichtsaufnahmen der Hirnoberfläche, z. B. zur Beurteilung der Integrität der Blut-Hirnschranke. Die durch die jeweils gefilterte Fluoreszenzemission sichtbaren Bildelemente konnten durch ein Okular (Periplan 10-fach; Fa. Leitz, Wetzlar) betrachtet werden oder direkt über einen C-Mount-Adapter von einer hochauflösenden Silikon-intensivierten Restlichtkamera (C2400-08, Fa. Hamamatsu Photonics, Japan), in einer Sensitivität von mindestens 50 μ A/ μ W im Spektrum von 400-650 nm, als Video aufgenommen werden. Zur

Fokussierung war das Mikroskop mit Kamera an einem motorgesteuerten Spindeltrieb mit manueller Feinjustierung befestigt. Die online Darstellung der Bilder erfolgte durch einen Trinitron Monitor (Fa. Sony, Japan) in 930-facher Vergrößerung. Gleichzeitig wurden sie zur späteren Analyse der einzelnen intravitalmikroskopischen Szenen mit einem S-VHS Videorecorder (AG-7350, Fa. Panasonic, Japan auf Videoband (KCA-60 BRS, Fa. Sony, Japan) in einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde aufgezeichnet. Ein Videotimer (VTG-33, Fa. FOR-A-Company Ltd., Japan) spielte Datum und Zeit (2/100 s-Schritte) ein.



Abb. 4: Schema des intravitalmikroskopischen Versuchsaufbaus. LEI: Leukozyten-Endothelinteraktionen, KD: Kapillardichte, SITS: Silikon intensified target system (lichtempfindliche Röhrenkamera) (aus Beck et. al).

2.4.3. Fluoreszenzfarbstoffe

Da sowohl Blutplasma, als auch Endothelzellen, Blutzellen und Leukozyten keine ausreichende Eigenfluoreszenz haben, wurden Fluoreszenzfarbstoffe (Tab. 2) eingesetzt. Hochmolekulares Dextran (durchschnittliches MG: 150.000 u; Fa. Sigma, Deisenhofen), dass an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt war, führte zu einer Kontrastverstärkung von Plasma. Vor den intravitalmikroskopischen Beobachtungen wurde ein 0,25 ml-Bolus einmal intravenös injiziert. Das Passieren einer intakten Blut-Hirnschranke ist aufgrund des Molekulargewichts von Dextran und anderer Eigenschaften nicht möglich (46). Um Mitochondrien und Kernstrukturen lebender Zellen zu färben, wurde Rhodamin 6G (Fa. Merck, Darmstadt), ein positiv geladener, lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, mit einem Molekulargewicht von 479 u, verwendet [3] [107]. Dadurch konnten Leukozyten in Blutgefäßen für die Intravitalmikroskopie sichtbar gemacht werden. Zur Darstellung durchbluteter Kapillare und somit zur Bestimmung der Kapillardichte, wurde zu jedem Messzeitpunkt 0,1 ml Rhodamin 6G (0,01%) über den venösen Katheter appliziert.

Zu jedem Versuchsende wurde Na⁺-Fluoreszein (Fa. Merck, Darmstadt) mit einem Molekulargewicht von 376u über den femoralen venösen Katheter gegeben, um eine Aussage über den Status der Blut-Hirnschranke treffen zu können.

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

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

Die auf Video aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden später an einem Auswertmonitor (Fa. Sony, Japan) bezüglich der zuvor festgelegten Versuchsparameter ausgewertet.

2.4.4. Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser

Die Durchmesserbestimmung von Arteriolen und Venolen wurden am Videostandbild mittels einer Schublehre mit Nonius-Skalierung ermittelt. Hierfür wurde nach Gabe von FITC-Dextran die Distanz von zwei gegenüberliegenden Punkten der Ränder der Gefäß-Plasma-Säule bestimmt [58]. Zur exakten Identifikation in den folgenden Aufnahmen wurden diese Punkte in einer Skizze des Gefäßbettes markiert. So konnten Gefäßkaliberschwankungen von 2-3 µm erfasst werden. Es wurden Arteriolen mit einem Durchmesser von 20-90 µm und Venolen mit einem Durchmesser von 20-60 µm ausgewertet.

2.4.5. Leukozyten-Endothelinteraktionen

Die Leukozyten-Endothelinteraktionen wurden quantitativ und offline anhand der Videoaufnahmen ausgewertet. Dabei wurden 3-4 Gefäßregionen über mindestens 30 s aufgezeichnet, die eine oder mehrere Venolen oder Arteriolen enthielten. Folgende Parameter wurden bestimmt:

Roller: Anzahl der am Gefäßendothel entlangrollenden Leukozyten mit mindestens einer Änderung der Fließgeschwindigkeit.

Sticker: Anzahl der am Gefäßendothel fest adhärenten Leukozyten, die ihre Position über eine Zeit von > 20 s nicht änderten.

Die Auszählung von Rollern und Stickern erfolgte in identischen Gefäßsegmenten von Arteriolen und Venolen auf einer Länge von 100 µm. Das Ergebnis ist als Zahl [n] von Leukozyten pro Gefäßabschnitt und Zeiteinheit wiedergegeben [n/100 µm*min⁻¹].

2.4.6. Kapillardichte

Die Messung der Kapillardichte wurde mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg) [115] durchgeführt, da sich dieses System schon bei den Versuchen zur globalen zerebralen Ischämie bei Beck et al. etabliert hatte [8].

Die ausgewählten Kapillaren wurden markiert und deren Dichte als gesamte Länge pro Beobachtungsfeld in cm/cm² angegeben. Zu jeder Versuchsaufnahme wurde dann ein 25 μ l Rhodamin 6G-Bolus intravenös appliziert. Die hierdurch intravitalmikroskopisch sichtbare und somit perfundierte Kapillare konnte zur Bestimmung der *Kapillardichte* (KD), definiert als Länge der mit Plasma (Rhodamin 6G) perfundierten Kapillaren pro Fläche, herangezogen werden.

Als *Plugger im Kapillargebiet* wurden im gleichen Beobachtungsfeld markierte Leukozyten gezählt, die eine Kapillare nicht länger als 20 sec. verschlossen. Hingegen wurden als *Sticker im Kapillargebiet* markierte Leukozyten bezeichnet, die, wiederum im gleichen Beobachtungsfeld, eine Kapillare länger 20 sec. verschlossen.

Perfundierte Venolen im Kapillargebiet waren kleine Gefäße im Kapillargebiet mit einem Durchmesser von ca. 4-8 µm, die durch die Bolusgabe während der intravitalmikroskopischen

Aufnahmen in der Stabilisierungsphase zu erkennen waren und während der Ischämie- und Reperfusionsphase sich kontrastierten oder nicht.

2.4.7. Integrität der Blut-Hirnschranke

Am Versuchsende wurde jedem Gerbil 0,2 ml des Farbstoffes Na⁺-Fluoreszein (Fa. Sigma, Deisenhofen) über einen Zeitraum von 1 Minute mittels Perfusor über die V. femoralis infundiert. Nach einem Zeitraum von 20 Minuten konnte die Integrität der Blut-Hirnschranke in der Übersichtsvergrößerung geprüft werden. Na⁺-Fluoreszein befindet sich bei intakter Blut-Hirnschranke nur intravasal. Bei einem Defekt kommt es dagegen zum Austritt des Farbstoffes in das umgebende Hirnparenchym.

2.5. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde am Versuchstag, sowie täglich in der postoperativen 4-tägigen Überlebensphase mit einer Waage (Ohaus LS 2000; Fa. Ohaus, USA) gemessen, um Aussagen über die Prognose nach transienter fokaler zerebraler Ischämie zu treffen.

2.6. Neurologische Untersuchung

Um den neurologischen, postischämischen Status der Tiere zu quantifizieren, verwendeten wir ein Testprotokoll zur Bestimmung eines Neuroscores, das von Bures et al. (52) für Ratten entwickelt wurde und inzwischen für Mongolische Wüstenrennmäuse [17] [105] [106] abgewandelt wurde. Dieses Testprotokoll wurde an jedem der 4 Untersuchungstage und jeweils 24 Stunden nach dem eigentlichen Ende der Ischämie während des Akutversuches durchgeführt und beinhaltete die unten aufgeführten Punkte:

Greifreflexe: Nach Bestreichen der Pfoten mit einem Holzstäbchen wird dieses fest umgriffen. *Ausrichtreflexe*: Beim Drehen des Rückens in eine Richtung bewegt sich der Kopf in die andere; wird das Tier auf den Rücken gelegt, dreht es sich sofort auf die Füße. Bei Annäherung des am Schwanz gehaltenen Gerbils an eine Unterlage werden beide Vorderpfoten ausgestreckt. *Kornealreflex*: Lidschluss nach Berührung der Kornea mit einem Wattebausch. *Pinnareflex*: Kopfschütteln nach Bestreichen des Ohrs.

Spontanmotilität: Keine Bewegungspausen von >30 s beim wachen Tier.

Circling: Laufen im Kreis.

Haltung: Keine Flexion der Vorderpfote oder Verdrehung des Thorax, wenn das Versuchstier am Schwanz gehalten wird.

Knabbern: Das Zernagen von Pappe.

Für die aufgeführten Verhaltensweisen bzw. das Bewältigen von Aufgaben wurden Punkte (Tab. 3) vergeben. Der normale Ausgangswert der Tiere vor fokaler zerebraler Ischämie betrug 23 Punkte.

Aufgabe	normale Punktzahl	gesamt	Defizit
Greifreflex	1 (pro Vorderpfote)	2	0
Fallreflex	1 (pro Vorderpfote)	2	0
Spontanmotilität	2	2	0
Circling	2	2	1 (am Schwanz gehalten), 0 (spontan)
Umdrehen	2	2	0
Flucht	2	2	0
Fell	2	2	0
Knabbern	2	2	0
Ptosis	2	2	1 (einseitig), 0 (beidseitig)
Lagophtalmus	1 pro Seite	2	0
Anfall	2 (kein)	2	1 (vereinzelt), 0 (Status)
Verdrehung Hals- Rumpf	1	1	0
Gesamtpunktzahl		23	

Tab. 3: Punkteskala zur Bewertung des neurologischen Status eines Versuchstieres.

2.7. Histologie

Zur Quantifizierung des ischämischen Parenchymschaden [25] [95] [65] wurde das Gehirn der Gerbilen histomorphometrisch analysiert.

Am Tag 4 nach Ende des Akutversuches wurden die Tiere mittels Äthernarkose (Fa. ASID Bonz, Böblingen) narkotisiert, dann thorakotomiert und mit Phosphat-gepufferter (pH 7,4) 4%-Paraformaldehydlösung [22] perfusionsfixiert. Dafür wurde der linke Herzventrikel durch den Apex cordis mit einer stumpfen 20 G Einmalkanüle (Fa. Braun, Melsungen) punktiert. Durch Eröffnung des rechten Herzohres konnte das gesamte Gefäßsystem gespült werden. Zunächst erfolgte dies mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung und einem Perfusionsdruck von 100 cm H₂O bis die aus dem rechten Herzen austretende Flüssigkeit klar war. Anschließend wurde für 15 Min die 4%-ige Paraformaldehydlösung zur Perfusionsfixation infundiert. Nach Entfernen der Kalotte mit einer Knochenzange und Eröffnen der Dura mater wurden der kaudale Hirnstamm und die Nervi olfactorii und optici durchtrennt, das Gehirn entnommen und in Paraformaldehydlösung (4%) eingelegt.

Nach mindestens 24 Stunden wurde das fixierte Gehirn mit einer Alkoholreihe steigender Konzentration entwässert. Zur Entfernung des Alkohols wurde das Gehirn danach in Methylsalicylat und Xylol (Fa. Merck, Darmstadt) suspendiert. Die mit Paraplast-plus (Fa. Monoject Scientific, Athy, Ireland) eingebetteten Präparate wurden mit einem Rotationsmikrotom in der Koronarebene seriell geschnitten (5 µm Schichtdicke), auf einem beschichteten Objektträger (SuperFrost, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgetragen und HE gefärbt.

2.7.1. Infarktausmessung

Mit Hilfe der digitalen Planimetrie wurde das Infarktvolumen in den beiden Hemisphären unter einem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen) ausgemessen.

Das Ausmaß der Infarzierung wurde mit der Formel von *Cavalieri* berechnet, nach der das Volumen des Infarktes gleich dem Abstand der untersuchten Schnitte multipliziert mit der Summe der, in diesem Fall infarzierten, Fläche pro Schnitt ist.

$V = d x \sum Areal$

Gleichung 2: Formel nach Cavalieri.

2.8. Versuchsgruppen und Protokolle

2.8.1. Versuchsgruppe ,Systemische Parameter'

In dieser eigenständigen Versuchsgruppe wurden jeweils 6 Tiere einer Kontroll- und einer Ischämiegruppe zugeteilt. Hiermit sollten eventuelle Einflüsse durch Veränderungen dieser Werte zwischen den Versuchsgruppen ausgeschlossen werden. Da die Tiere nur über ein geringes Blutvolumen verfügen, konnten diese Werte nicht während der eigentlichen Versuchsreihe gemessen werden. Nach Narkotisierung der Tiere erfolgte die Präparation mit Implantation des arteriellen und venösen Katheters und die Präparation und Umschlingung der rechten A. carotis. In der Ischämiegruppe wurde durch Anhängen einer chirurgischen Klemme die transiente fokale zerebrale Ischämie induziert, während in der Kontrollgruppe dies nicht

erfolgte. In beiden Gruppen wurde der Faden nach 2 Stunden wieder gezogen. Über den arteriellen Katheter erfolgten 2 Blutabnahmen. Einmal 60 Minuten vor Beginn der Ischämie und einmal 3 Stunden nach Ende der 2-stündigen Ischämie. Ein transdurales Schädelfenster wurde nicht gebohrt und somit konnten in beiden Gruppen keine intravitalmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt werden.

2.8.2. Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion'

In diese Versuchsgruppe wurden 9 Kontrolltiere und 22 Versuchstiere eingeschlossen. Aufgrund der umfangreichen Präparation und der langen Versuchszeit wurden keine großen Tieranzahlen pro Gruppe erreicht. Da trotz äußerst sorgfältiger Präparation es unbeobachtet zu Verletzungen der Dura mater kommen konnte und dies zu einer Aktivierung von Leukozyten führte, wurden Versuchstiere erst bei Durchsicht der Aufzeichnungen nach Versuchsende als valide oder nicht valide eingestuft. In der Kontrollgruppe wurde ein venöser und ein arterieller Gefäßkatheter implantiert und die rechte A. carotis umschlungen. Anschließend wurde das transdurale Schädelfenster gebohrt. Eine Ischämie wurde in dieser Gruppe nicht herbeigeführt. In der Ischämiegruppe erfolgte die gleiche Präparation wie in der Kontrollgruppe. Die fokale zerebrale Ischämie wurde durch Anhängen der chirurgischen Klemme an den Carotisfaden induziert. Nach der chirurgischen Präparation der beiden Katheter, des Carotisfaden und des transduralen Schädelfensters, was ca. 70-90 Minuten dauerte, folgten in der 1-stündigen Stabilisierungsphase, der 2-stündigen Ischämiephase und 3-stündigen Reperfusionsphase intravitalmiksokopische Aufnahmen der Mikrozirkulation zur Bestimmung der oben angegebenen Parameter. Die Belichtung der Hirnoberfläche mit L3-gefiltertem Licht zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers dauerte 5s, mit N2-gefiltretem Licht zur Bestimmung der Leukozytenendothelinteraktion und der Kapillardichte jeweils 30s für jede Aufnahmeperiode. Anschließend wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 4 Tagen täglich neurologisch untersucht und das Körpergewicht gemessen. Am 4. postischämischen Tag wurde die Perfusionsfixation des Gehirns mit Paraformaldehyd durchgeführt und die entnommenen Gehirne histologisch untersucht.



Abb. 5: Protokoll für die Versuchsgruppe ,Früher Reperfusion'. Nach der Präparation und der1-stündigen Kontrollphase erfolgte die 2-stündige Ischämiephase, gefolgt von der 3stündigen Reperfusionsphase. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden zu den markierten Zeitpunkten durchgeführt. Nach 4-tägiger neurologischer Beobachtungsphase wurden die Gehirne nach Perfusionsfixation entnommen und histologisch untersucht.

2.8.3. Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion' und unterschiedliche Ischämietiefe

Eine genaue Vorhersage des zerebralen Durchblutungsabfalls war nicht möglich und manipulative Maßnahmen nicht gewollt, um Störeinflüße auf die Untersuchungsparameter auszuschließen. Allerdings wiesen Hallenbeck et al. bereits 1990 [45] darauf hin, dass eine Infarktentstehung sowohl von der Abnahme der zerebralen Durchblutung, der sogenannten Ischämietiefe, als auch der Dauer der Ischämie abhängig ist. Anhand der untenstehenden Abbildung wird deutlich, dass, wenn die residuelle Durchblutung höher ist, das betroffene Gewebe überlebt, auch wenn die Ischämie länger anhält. Ist die residuelle Durchblutung sehr niedrig aber die Ischämiedauer kurz, muss es nicht zu einem Gewebeuntergang im betroffen Hirnareal kommen.



Abb. 6:Zusammenhang der Ischämietiefe und der Ischämiedauer nach Hallenbeck et al.[45]

Wir teilten alle Ischämietiere der Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion' daher in 3 Gruppen ein. Eine Gruppe mit einer Restdurchblutung während der 2-stündigen Ischämiephase die deutlich unter der von Hallenbeck et al. [45] beschriebenen Infarktschwelle lag. Diese Tiere zeigten eine Restdurchblutung von < 10% des Ausgangswertes. Die zweite Gruppe lag mit der Restdurchblutung während der Ischämiephase nur noch knapp unter der beschriebenen Infarktschwelle. Hier lag die Restdurchblutung > 10% und < 30% des Ausgangswertes aus der Stabilisierungsphase.

Eine Abnahme der Durchblutung während der Ischämiephase von > 30% des Ausgangswertes, und somit oberhalb der Infarktschwelle, zeigten Tiere der dritten Gruppe.

Anhand dieser Einteilung sollte nachvollzogen werden können, inwieweit die Durchblutungsabnahme während der 2-stündigen Ischämie Einfluss auf die gemessenen Parameter hat.

2.8.4. Versuchsgruppe ,Späte Reperfusion'

In diese eigenständige Versuchsgruppe wurden 8 Kontrolltiere und 32 Ischämietiere eingeschlossen. Bei allen Tieren wurde zunächst die rechte A. carotis präpariert und diese mit einem Faden umschlungen. Nur in der Versuchsgruppe wurde dann eine 2-stündige Ischämie herbeigeführt, in gleicher Weise wie oben beschrieben. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden diesmal aber 12h, 24h, 48h, 72h oder 96h nach Ende der Ischämie durchgeführt. Sie erfolgten an 2 Zeitpunkten über einen Zeitraum von 1 Stunde. Hierfür wurde jedem Tier ein venöser und arterieller Katheter implantiert und das transdurale Schädelfenster gebohrt. Alle Tiere wurden nach Ende dieser Aufnahmen perfusionsfixiert und die Gehirne für die Histologie in Paraformaldehyd eingelegt.



Abb. 7: Protokoll für die Versuchsgruppe ,Späte Reperfusion'. Die Reperfusion dauerte je nach Versuchsgruppe 12, 24, 48, 72 oder 96 Stunden. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach Implantation der Katheter und Präparation des Schädelfensters.

Auch in dieser Versuchsreihe war eine Vorhersage der Durchblutungsabnahme während der Ischämiephase nicht möglich. Die untenstehende Tabelle zeigt die Tieranzahl pro Versuchsgruppe und Dauer bis zu den intravitalmikroskopischen Aufnahmen nach Ende der Ischämie. Da in manchen Fällen nur wenige bis gar keine Tiere in eine der Gruppen fielen, war eine Unterteilung in die verschiedenen Ischämiegruppen nicht sinnvoll. Daher wurde nur eine Kontrollgruppe und eine Ischämiegruppe, jeweils mit Unterteilung in die angegebenen Zeitintervalle bis zu den intravitalmikroskopischen Aufnahmen gebildet.

Versuchsgruppe	12h	24h	48h	72h	96h	insgesamt
< 10%	0	1	1	1	0	3
> 10% und < 30%	3	3	3	2	1	12
> 30%	2	3	2	5	5	17
Kontrollgruppe	1	1	2	2	2	8

Tab. 4: Tabelle über die Tieranzahl pro Versuchsgruppe und Zeitintervall bis zur Durchführung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen nach Ende der fokalen zerebralen Ischämie.

2.9. Statistik

Die Ergebnisse wurden mit einem Personalcomputer unter Verwendung des SigmaStat-Programms (Version 12.5, Systat Software GmbH, Erkrath) statistisch ausgewertet. Nach Prüfen auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe parametrischer oder bei nicht Normalverteilung mit nicht-parametrischen Tests auf Signifikanz analysiert. Für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen bei nichtnormalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Student-Newman-Keulsoder Dunn's Test eingesetzt; lagen nur zwei Gruppen vor so wurde der T-Test oder bei nicht Normalverteilung der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei Gruppen mit geringer Tieranzahl wurde immer aufgrund der geringen n-Zahl ein nicht-parametrisches Testverfahren verwendet. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p<5% zur Ablehnung der Nullhypothese festgelegt. Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollparameter

3.1.1. Systemische Parameter

Der p_aO_2 - Wert fiel in beiden Gruppen zum Versuchsende hin ab. In der Kontrollgruppe von 120,02 mmHg auf 108,27 mmHg, in der Ischämiegruppe von 131,43 mmHg auf 124,55 mmHg. Der arteriell gemessene CO2 Partialdruck fiel ebenfalls zum Versuchsende in beiden Gruppen ab.

Nach 6- stündiger Versuchsdauer waren alle Tiere der Versuchsreihe azidotisch, in der Kontrollgruppe mit pH 7,25 etwas weniger als in der Ischämiegruppe mit pH 7,21.

Während der p_aO₂, p_aCO₂, der pH und der Blutzuckergehalt über die gesamte Versuchsdauer mehrfach bestimmt wurden, wurde der Hämoglobingehalt sowie die Leukozytenzahl nur gleich zu Beginn und am Ende des jeweiligen Versuches gemessen.

Dabei zeigten die Leukozytenzahlen einen Anstieg in beiden Gruppen zum Versuchsende hin. Der Hämoglobingehalt fiel dagegen in beiden Gruppen um jeweils etwas mehr als 1 mg/dl zum Versuchsende hin.

Der arterielle Blutzuckergehalt stieg in der Kontrollgruppe an, während er in der Ischämiegruppe abfiel. Statistisch zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

	Versuchsbeginn		Versuchsende	
	Kontrolle	Ischämie	Kontrolle	Ischämie
paO ₂ [mmHg]	$120,02 \pm 4,45$	131,43 ± 4,39	108,27 ± 11,03	124,55 ± 7,75
paCO ₂ [mmHg]	40,53 ± 0,81	38,52 ± 0,48	38,17 ± 2,42	36,60 ± 1,96
РН	7,33 ± 0,01	7,33 ± 0,02	7,25 ± 0,01	7,21 ± 0,02
Hämoglobin [mg/dl]	13,6±0,32	13,47 ± 0,35	12,34 ± 0,62	12,36±0,71
Leukozyten [109/l]	11,79 ± 1,24	9,86±1,30	15,79 ± 2,46	13,96 ± 2,43
Glukose [mg/dl]	115,67 ± 3,90	138,00± 18,44	118,67 ± 11,26	128,17 ± 5,52

Tab. 5:Gemessene Blutgasanalysen der Kontroll- und Ischämietiere. Es zeigten sich
keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.1.2. Makrohämodynamik – Mittlerer arterieller Blutdruck Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion'

Der arterielle Mitteldruck, kurz MAD genannt, der Kontroll- und der Ischämietiere war in der Ausgangsphase mit 74 ±5 mmHg und 75 ±10 mmHg nahezu identisch. Im weiteren Verlauf erkennt man in der Versuchsgruppe nach Induktion der Ischämie einen Anstieg des MAD, gefolgt von einem Abfall während der übrigen Ischämiephase. Zu Beginn der Reperfusionsphase zeigte sich wiederum ein geringer Anstieg, der aber statistisch nicht signifikant war.

Während der Ischämiephase kam es zum Zeitpunkt 5 Minuten in der Gruppe mit Ischämie zu einem signifikanten Anstieg des MAD. Diese Signifikanz bestand gegenüber den beiden späteren Ischämiezeitpunkten 60 Min. und 120 Min. sowie zu allen 4 Messzeitpunkten der Reperfusionsphase dieser Gruppe (* p < 0,05 vs. \geq 5 Min.).

Außerdem war in der Ischämiegruppe der MAD-Wert des Stabilisierungszeitpunkt -60 Min. signifikant erhöht gegenüber den Ischämiezeitpunkten 60 Min., 120 Min. und Reperfusionszeitpunkt 300 Min. (# p < 0.05 vs. 60, 120, 300 Min.).

In der Kontrollgruppe war lediglich der erste MAD-Wert in der Stabilisierungsphase signifikant verschieden zum Reperfusionszeitpunkt 300 Min.



Abb. 8: Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks vor, während und nach der Ischämie in der Kontroll- und der Ischämiegruppe. * p < 0.05 vs. ≥ 5 Min., # p < 0.05 vs. 60, 120, 300 Min.

3.1.3. Makrohämodynamik – Mittlerer arterieller Blutdruck Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion' und unterschiedliche Ischämietiefen

Die dargestellte Abbildung zeigt den Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks der Kontrollgruppe sowie der 3 Ischämiegruppen während der gesamten Versuchszeit. In der Grafik sind die jeweiligen Blutdruckwerte zu den intravitalmikroskopischen Untersuchungszeitpunkten aufgeführt.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und allen Ischämiegruppen über alle Zeitpunkte zusammen (p > 0.05).

In der Gruppe mit einer Restdurchblutung < 10% war zum Ischämiezeitpunkt 60 Min. der MAD gegen die Ischämiezeitpunkte 5 Min. sowie die Reperfusionszeitpunkte 150 Min. und 180 Min. signifikant erniedrigt (* p < 0,05 vs. 5, 150, und 180 Min.). Außerdem war der Wert zum Ischämiezeitpunkt 120 Min. in dieser Gruppe signifikant gegenüber den Ischämiezeitpunkten 5 Min. und dem Reperfusionszeitpunkt 150 Min. erniedrigt (# p < 0,05 vs. 5 und 150 Min.).

In der Gruppe mit einer Restdurchblutung > 10 % und < 30% zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In der dritten Ischämiegruppe mit einer Restdurchblutung > 30% war der MAD-Wert des Ischämiezeitpunktes 5 Min. gegenüber dem Reperfusionszeitpunkt 150 Min. signifikant erhöht (\$ p < 0.05 vs. 150 Min.).

Bei der Betrachtung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte war der Wert des Reperfusionszeitpunktes 150 Min in der Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe < 10% signifikant gegenüber den beiden anderen Ischämie- sowie der Kontrollgruppe erhöht (§ p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, Ischämietiefe < 30% und Ischämietiefe > 30%).



Abb. 9: Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks vor, während und nach der Ischämie in der Kontrollgruppe und den 3 Ischämiegruppen, Restdurchblutung < 10% mit * p < 0,05 vs. 5, 150, und 180 Min., # p < 0,05 vs. 5 und 150 Min., \$ p < 0,05 vs. 150 Min., Restdurchblutung < 10% mit § p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, Restdurchblutung > 10 und < 30% und Restdurchblutung > 30%.

3.2. Zielparameter – Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion'

3.2.1. Arterielle Gefäßdurchmesser

In den ersten 60 Minuten des Versuches fanden sich keine Unterschiede in der Kontroll- und der Versuchsgruppe bezüglich des arteriellen Gefäßdurchmessers. In der Kontrollgruppe blieb während der Ischämiephase der arterielle Gefäßdurchmesser konstant. In der Ischämiegruppe kam es nach Induktion der Ischämie durch die einseitige Karotisokklusion zu einer Abnahme des arteriellen Gefäßdurchmessers, der am Ende der Ischämie wieder leicht zunahm.

Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe über alle Untersuchungszeitpunkte insgesamt. Ebenso zeigten sich sowohl zwischen den beiden Gruppen zu den einzelnen Versuchszeitpunkten, als auch innerhalb der Kontrollgruppe keine statistischen Unterschiede über den gesamten Versuchszeitraum.
Bei der statistischen Betrachtung der Ischämietiere über die Versuchszeit waren die arteriellen Gefäßdurchmesser signifikant erniedrigt zu den Ischämiezeitpunkten 5 Min., 60 Min. und 120 Min. gegenüber allen Stabilisierungs– und allen Reperfusionszeitpunkten (* p < 0.05 vs. 5, 60, 120 Min.).



Abb. 10: Darstellung der Gefäßdurchmesser der untersuchten Arteriolen in der Kontroll- und der Ischämiegruppe. * p < 0,05 vs. gegenüber -60, -30, 150, 180, 240 und 300 Min.

3.2.2. Venöse Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser der postkapillären Venolen blieben in der Kontroll- und Ischämiegruppe während der gesamten Versuchszeit konstant. Es zeigten sich statistisch keine signifikanten Veränderungen während der Kontroll-, der Ischämie- und der Reperfusionsphase.



Abb. 11: Darstellung der Gefäßdurchmesser der untersuchten Venolen in der Kontrollund der Ischämiegruppe.

3.2.3. Laser-Doppler-Fluxmetrie

In der folgenden Abbildung sind die während des gesamten Versuches gemessenen Laser-Doppler-Fluxmetriewerte der Kontroll – und Ischämiegruppe gegen die Zeit aufgezeichnet und die gemessenen Werte in Prozent vom Ausgangswert dargestellt. Dieser Wert ist dem Mittelwert der beiden Werte der Stabilisierungsphase äquivalent.

In der Kontrollgruppe kam es insgesamt über die Zeit zu einem leichten Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert. Dieser war aber statistisch nicht signifikant (p > 0,05). In der Ischämiegruppe erkennt man dagegen einen deutlichen Abfall des Laser-Doppler-Wertes nach Induktion der Ischämie. Sofort nach Beendigung der Karotisokklusion war der Laser-Doppler-Wert gegenüber dem Ausgangswert erhöht, fiel danach zum Zeitpunkt 180 Minuten der Reperfusion bis auf das Ausgangsniveau wieder ab um zu den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten leicht über dem Ausgangswert zu liegen. In der Ischämiegruppe waren die Laser-Doppler-Fluxmetriewerte während der Ischämiephase zur Stabilisierungsphase und zu allen 4 Zeitpunkten der Reperfusionsphase signifikant erniedrigt (* p < 0.05 vs. -60, 150, 180, 240 und 300 Min.).

Vergleicht man die beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten, so zeigten sich signifikante Unterschiede nur zu den Ischämiezeitpunkten 5 Min., 60 Min. und 120 Min. (# p < 0,05 vs. 5 Min., 60 Min., 120 Min.)



Abb. 12: Darstellung des Laser-Doppler-Flow in der Kontroll- und der Ischämiegruppe. * p < 0.05 vs. -60, 150, 180, 240 und 300 Min., # p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.2.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Roller venös/arteriell

Roller venös

Die graphische Darstellung der am venösen Gefäßendothel entlangrollenden Leukozyten zeigt nicht nur einen erhöhten Wert gleich nach Ende der 2-stündigen Ischämiephase, sondern auch einen zunehmenden Anstieg der Roller in der Ischämiegruppe während der gesamten Reperfusionsphase. In der Kontrollgruppe hingegen sieht man nur einen sehr geringen Anstieg. Die statistische Auswertung zeigt keine Unterschiede zwischen der Kontroll– und Ischämiegruppe über alle Zeitpunkte insgesamt. Auch innerhalb der Kontrollgruppe über die gesamte Versuchszeit hinweg gab es keine signifikanten Unterschiede. Allerdings war in der Ischämiegruppe der Anstieg der Roller zu jedem Zeitpunkt der Reperfusionsphase signifikant zu den Zeitpunkten der Stabilisierungsphase (* p < 0,05 vs. -60 und -30 Min.).

Da während der Dauer der Karotisokklusion die Durchblutung in den Venolen der Versuchsgruppe deutlich verringert war, konnte während dieser Phase die Auswertung nicht exakt durchgeführt werden. Dieser Bereich wurde daher nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen und in der Graphik grau schraffiert.



Abb. 13: Darstellung der Roller in venösen Gefäßen in der Kontroll- und der Ischämiegruppe, * p < 0.05 vs. -60 und -30 Min.

Roller arteriell

Die folgende Graphik zeigt die rollenden Leukozyten in den Arteriolen der Gruppen. Nach Beendigung der Ischämie zeigte sich graphisch zu zwei Zeitpunkten der Reperfusionsphase ein sehr geringer Anstieg der arteriellen Roller in beiden Gruppen. Dieser war aber in keiner der beiden Gruppen statistisch signifikant (p > 0,05).

Da auch während der Ischämiephase der Blutfluss in den Arteriolen deutlich verringert war, konnte die Auswertung nicht exakt durchgeführt werden und wurde daher auch nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen.



Abb. 14: Darstellung der Roller in arteriellen Gefäßen in der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

3.2.5. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Sticker venös/arteriell

Sticker venös

Die Anzahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen fest anheftende Leukozyten sind in der folgenden Graphik dargestellt. Wiederum wurde die Ischämiephase ausgegrenzt, da hier aufgrund der verminderten Durchblutung und Flussrate keine Unterscheidung zwischen rollenden und fest anheftenden Leukozyten getroffen werden konnte.

Man erkennt, dass es in der Kontrollgruppe während der Reperfusion kaum zu Leukozytenadhärenz an den Gefäßwänden kam.

In der Ischämiegruppe zeigt sich ab dem ersten Meßzeitpunkt nach Ende der Ischämie eine sehr gering erhöhte Leukozytenadhärenz. Diese Adhärenz hält sich auf leicht erhöhtem Niveau bis zum Ende der Reperfusionsphase gegenüber der Stabilisierungsphase.

Statistisch gab es keine Signifikanzen zwischen beiden Gruppen über alle Zeitpunkte zusammen sowie innerhalb der beiden Versuchsgruppen zu den einzelnen Zeitpunkten (p > 0.05).



Abb. 15: Darstellung der Sticker in venösen Gefäßen in der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

Sticker arteriell

Anschließend sind die ermittelten Werte arterieller Sticker, also an einer Arteriolenwand fest anheftender Leukozyten, dargestellt.

Die statistische Auswertung ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe zwischen der Stabilisierungsphase und jedem der 4 einzelnen Zeitpunkte in der Reperfusionsphase (p > 0,05). Die schraffierte Fläche zeigt wiederum den nicht in die Bewertung eingeflossenen Messbereich der Ischämiephase.



Abb. 16: Darstellung der Sticker in arteriellen Gefäßen in der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

3.2.6. Kapillardichte

Die hier dargestellte Kapillardichte der Kontroll- und Ischämiegruppe ist in Prozent des Ausgangswertes der Stabilisierungsphase dargestellt. Sie fällt in der Ischämiegruppe nach Karotisokklusion deutlich ab. Nach Ende der 2-stündigen Ischämiephase

erholt sie sich während der 3-stündigen Reperfusionsphase nur teilweise, erreicht aber nicht das Ausgangsniveau.

Innerhalb der Kontrollgruppe konnten keine Signifikanzen gefunden werden (p > 0,05).

In der Ischämiegruppe hingegen war die Abnahme der Kapillardichte in der Ischämie- und der Reperfusionsphase signifikant zum Ausgangswert.

(* p < 0,05 vs. - 60 Min.).

Außerdem zeigten sich ab dem Zeitpunkt 5 Minuten, also kurz nach Induktion der Ischämie, signifikante Unterschiede zu jedem einzelnen der folgenden Untersuchungszeitpunkte zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe. (# p < 0.05 vs. Kontrollgruppe)



Abb. 17: Darstellung der Kapillardichte in der Kontroll- und der Ischämiegruppe, * p < 0.05 vs. -60 Min., # p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.2.7. Plugger Kapillargebiet

Die folgende Graphik zeigt die Anzahl an Plugger im untersuchten Kapillargebiet. Diese bleiben auf Ausgangsniveau bis zum Ende der Reperfusionsphase. Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05). Die Ischämiephase wurde wiederum nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen.



Abb. 18: Darstellung der Plugger im Kapillargebiet in der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

3.2.8. Sticker Kapillargebiet

Der dauerhafte Verschluss von Kapillargefäßen durch sogenannte Sticker ist in der folgenden Abbildung für beide Gruppen dargestellt. Die Ischämiephase wurde wieder nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen. Es zeigten sich auch hier keine Signifikanzen (p > 0,05).



Abb. 19: Darstellung der Sticker im Kapillargebiet in der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

3.2.9. Perfundierte Venolen Kapillargebiet

Nachfolgend werden die perfundierten Venolen im untersuchten Kapillargebiet der beiden Versuchsgruppen in Prozent vom Ausgangswert der Stabilisierungsphase abgebildet.

Hierbei erkennt man, dass es während der 2-stündigen Ischämiephase in der Ischämiegruppe zu einer deutlichen Abnahme von perfundierten Venolen kommt, der sich mit Beginn der Reperfusionsphase wieder erholt aber das Ausgangsniveau nicht wieder erreicht.

Es zeigten sich statistisch keine Signifikanzen zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe über alle Zeitpunkte zusammen. Auch gab es keine Signifikanzen innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten (p > 0.05).

Dagegen ist zu erkennen, dass sich die Anzahl perfundierter Venolen in der Ischämiegruppe zwischen der Stabilisierungsphase und den Ischämiezeitpunkten 5 Min., 60 Min. und 120 Min. sowie dem Reperfusionszeitpunkt 150 Min. signifikant erniedrigt ist (* p < 0,05 vs. 5 Min., 60 Min., 120 Min., 150 Min.).

Die Anzahl perfundierter Venolen zu den Reperfusionszeitpunkten 180 Min., 240 Min. und 300 Min. war zu den drei Ischämiezeitpunkten signifikant erhöht (# p < 0,05 vs. 5, 60 und 120 Min). Zusätzlich besteht ein signifikanter Unterschied in der Anzahl zum Reperfusionszeitpunkt 150 Min. im Vergleich zu den Ischämiezeitpunkten 60 Min. und 120 Min. (\$ p < 0,05 vs. 60 und 120 Min. 120 Min.).



Abb. 20: Darstellung perfundierter Venolen im untersuchten Kapillargebiet in der Kontroll- und der Ischämiegruppe. * $p \leq 0.05 \text{ yr} = 5.60, 120 \text{ und } 150 \text{ Min} + p \leq 0.05 \text{ yr} = 5.60 \text{ und } 120 \text{ m} + p \leq 0.05 \text{ wr} = 5.60 \text{ und } 120 \text{ m} + p \leq 0.05 \text{ wr} = 5.60 \text{ und } 120 \text{ m} + p \leq 0.05 \text{ wr} = 5.60 \text{ und } 120 \text{ m} + p \leq 0.05 \text{ wr} = 5.60 \text{ m} + p \leq 0$

* p < 0.05 vs. 5, 60, 120 und 150 Min., # p < 0.05 vs, 5, 60 und 120 Min., \$ p < 0.05 vs. 60 und 120 Min., $\Omega p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe.

Zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe bestehen signifikante Unterschiede zu allen drei Ischämiezeitpunkten ($\Omega p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe) aber keine Signifikanzen in der Stabilisierungs- und der gesamten Reperfusionsphase (p > 0.05).

3.2.10. Blut-Hirnschranke

Die intravitalmikroskopische Prüfung der Blut-Hirnschranken-Integrität wurde bei allen Tieren am Ende der Reperfusionsphase und 20 Minuten nach Gabe des Na⁺- Fluoreszein durchgeführt. Dabei wurde unterschieden, ob die Blut-Hirnschranke intakt, fokal oder generalisiert defekt war.

Man erkennt in der Abbildung, dass in der Kontrollgruppe deutlich häufiger die Blut-Hirnschranke, nämlich bei ca. 80% der Tiere, intakt war. Auch waren fokale oder generalisierte Defekte in der Kontrollgruppe deutlich seltener im Vergleich zur Versuchsgruppe. Statistisch gab es innerhalb der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied bzgl. der Intaktheit der Blut-Hirnschranke (* p < 0,05 vs. fokal defekt und generalisiert defekt). Innerhalb der Versuchsgruppe gab es allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied.



Abb. 21: Zustand der Blut-Hirnschranke in der Kontroll- und der Ischämiegruppe, * p < 0.05 vs. Fokal defekt und generalisiert defekt.

3.2.11. Neuroscore

Jedes Tier wurde am Versuchstag vor der Narkose neurologisch untersucht. Dieser Wert spiegelt als Ausgangswert den Tag 0 wieder. An den folgenden Tagen wurde jeweils ca. 24 Stunden nach Versuchende die gleiche neurologische Untersuchung durchgeführt.

Man erkennt in der Graphik eine deutliche Abnahme des Neuroscores am 1. Tag, der in der Kontrollgruppe dann wieder ansteigt, während in der Ischämiegruppe eine weitere, aber diesmal geringere Abnahme zu erkennen ist. In beiden Gruppen wird der Ausgangswert nicht wieder erreicht.

In der statistischen Auswertung zeigten sich innerhalb der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05). In der Ischämiegruppe dagegen zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme im Neuroscore an allen 4 postischämischen Tagen im Vergleich zu Tag 0 (* p < 0,05 vs. Tag 0).

Auch bei der statistischen Betrachtung zwischen Kontroll- und Ischämiegruppe zeigte sich, dass die Tiere der Ischämiegruppe einen statistisch signifikant niedrigeren Neuroscorewert an den Untersuchungstagen 2, 3 und 4 aufwiesen (# p < 0.05 vs. Kontrollgruppe).



Abb. 22: Verlauf des Neuroscores in der Kontroll- und der Ischämiegruppe in der postischämischen Beobachtungsphase, * p < 0.05 vs. Tag 0, #p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.2.12. Körpergewicht

In der folgenden Abbildung ist das täglich gemessene Körpergewicht aufgezeigt. Man erkennt, dass das Körpergewicht bei allen Tieren abnimmt. An Untersuchungstag 4 steigt das Körpergewicht in beiden Gruppen wieder leicht an.

Statistisch gab es eine signifikante Abnahme innerhalb der Kontroll- und Ischämiegruppe von allen 4 postischämischen Tagen gegenüber Tag 0 (* p < 0.05 vs. Tag 0 in Kontroll- und

Versuchsgruppe), sowie von Tag 1 gegenüber Tag 2 - 4 (# p < 0,05 vs. Tag 1 in Kontroll- und Ischämiegruppe).

Zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten (p > 0.05).



Abb. 23: Verlauf des Körpergewichtes in der Kontroll- und der Ischämiegruppe in der postischämischen Beobachtungsphase, * p < 0.05 vs. Tag 0 in Kontroll- und Versuchsgruppe, # p < 0.05 vs. Tag 1 in Kontroll- und Ischämiegruppe.

3.2.13. Infarktvolumen

4 Tage nach Beendigung des Akutversuches und damit nach Ende des postischämischen Untersuchungszeitraums wurden die Tiere erneut narkotisiert, perfusionsfixiert und die Gehirne in toto entnommen. Anschließend erfolgte die histologische Untersuchung zur Bestimmung des Infarktvolumens.

Bei der statistischen Auswertung zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe hinsichtlich der Infarktgröße (** p < 0,01 vs. Kontrollgruppe).



Abb. 24: Infarktvolumen in % der ipsilateralen Hemisphäre in der Kontroll- und der Ischämiegruppe, *p < 0.01 vs. Kontrollgruppe.

3.2.14. Korrelationsgraphik Laser-Doppler-Fluxmetrie gegenüber Infarkt

Stellt man die, mittels Laser-Doppler-Fluxmetrie gemessene, Durchblutungsabnahme während der 2-stündigen Ischämiephase dem histologisch gemessenen Infarktvolumen der betroffenen Hemisphäre aller Tiere gegenüber, so erkennt man, dass ab einer Durchblutungsabnahme von ca. 20% und niedriger vom Ausgangswert der Kontrollphase ein Infarkt fast immer messbar ist.



Abb. 25: Darstellung der Korrelation von Infarktvolumen gegenüber der Abnahme des Laser-Doppler-Flux bei Tieren der Kontroll- und der Ischämiegruppe.

3.2.15. Überleben

Die unten dargestellte Graphik zeigt das Überleben der Kontroll – und Ischämietiere nach dem Ende des Akutversuches. Die Anzahl der Tiere wurde in Prozent vom Ausgangswert, in diesem Fall dem OP-Tag, dargestellt. In der Ischämiegruppe zeigte sich eine Abnahme der Tieranzahl ab dem 2. Tag der postischämischen Kontrollphase.

Bei der statistischen Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Überlebens gefunden werden (p > 0,05).



Abb. 26: Überleben der Tiere der Kontroll- und der Ischämiegruppe nach Ende des Akutversuches.

3.3. Zielparameter – Versuchsgruppe ,Frühe Reperfusion' und unterschiedliche Ischämiegruppen

3.3.1. Arterielle Gefäßdurchmesser

Dargestellt sind die Veränderungen der Gefäßdurchmesser der Arteriolen der verschiedenen Ischämiegruppen über den Versuchszeitraum.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der arteriellen Gefäßdurchmesser zwischen der Kontrollgruppe und allen Ischämiegruppen über alle Zeitpunkte zusammen (p > 0,05). Auch innerhalb der Kontrollgruppe waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachzuweisen (p > 0,05).

In der Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe < 10% waren die arteriellen Gefäßdurchmesser zu den Reperfusionszeitpunkten 150 Min. und 180 Min. zu allen Ischämiezeitpunkten, sowie der Ischämiezeitpunkt 5 Min. zusätzlich noch zu den beiden Zeitpunkten der Stabilisierungsphase und zu den Zeitpunkten 240 Min. und 300 Min. der Reperfusionsphase statistisch signifikant verschieden (p < 0.05).

In der Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe > 10 % und < 30% waren die gemessenen arteriellen Gefäßdurchmesser aller drei Ischämiezeitpunkte zum 1. Messwert der Stabilisierungsphase signifikant verschieden (p < 0.05).

In der letzten Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe >30% zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede (p > 0,05).



Abb. 28: Darstellung der Gefäßdurchmesser der untersuchten Arteriolen in der Kontrollund den 3 Ischämiegruppen, Ischämietiefe < 10% mit * p < 0.05 vs. 5, 60 und 120 Min., # p < 0.05 vs. -60, -30, 150, 180, 240 und 300 Min., Ischämietiefe < 30% mit § vs. -60 Min.

3.3.2. Venöse Gefäßdurchmesser

Hier gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und allen drei Ischämiegruppen hinsichtlich der Veränderungen des Gefäßdurchmessers der Venolen (p > 0,05).



Abb. 29: Darstellung der Gefäßdurchmesser der untersuchten Venolen in der Kontrollund den 3 Ischämiegruppen.

3.3.3. Laser–Doppler-Fluxmetrie

Bei der Betrachtung des Verlaufs der Laser-Doppler-Werte zeigte sich ein sehr unterschiedlicher Verlauf des Laser-Doppler-Flux je Ischämiegruppe in der Reperfusionsphase. In der Ischämiegruppe < 10% kam es 30 Minuten nach Beendigung der Karotisokklusion zu einer Hyperperfusion, gefolgt von einer Hypoperfusion zum Reperfusionszeitpunkt 180 Min. Danach verzeichneten wir einen langsamen Anstieg des Laser-Doppler-Flux. Am Ende des Versuches wurde das Niveau der anderen Tiere erreicht, welches gering über dem Wert der Stabilisierungsphase lag.

In der Ischämiegruppe < 30% kam es zu keiner Hyperperfusion, sondern die Hypoperfusion zum Reperfusionszeitpunkt 150 Minuten stieg über den restlichen Untersuchungszeitraum langsam an und erreichte das Niveau der anderen Tiere, inklusive der Kontrolltiere. Auch in der dritten Gruppe kam es nicht zu einer Hyperperfusion wie in der Ischämiegruppe mit Ischämie < 10%. Allerdings war der Laser-Doppler-Fluxwert zum Reperfusionszeitpunkt 150 Minuten genauso leicht erhöht gegenüber dem Wert der Stabilisierungsphase wie der Wert zum gleichen Zeitpunkt in der Kontrollgruppe.

Innerhalb der Ischämiegruppe < 10% sind alle 3 Ischämiezeitpunkte zur Stabilisierungsphase sowie zu allen 4 Reperfusionszeitpunkten, sowie der Reperfusionszeitpunkt 150 Min. zum Reperfusionszeitpunkt 180 Min. signifikant verschieden (* p < 0.05).

In den beiden Gruppen mit einer Abnahme der Hirndurchblutung > 10% und < 30% und > 30% gegenüber dem Wert der Stabilisierungsphase waren auch die Laser-Doppler-Werte der Ischämiephase gegenüber der Stabilisierungs- und Reperfusionsphase signifikant verschieden. Zu den 3 Ischämiezeitpunkten sind alle 3 Ischämiegruppen deutlich signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (** p <0,001).

Bei der Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte zeigt sich, dass sich zum Reperfusionszeitpunkt 150 Minuten die Ischämiegruppe < 30% zur Kontrollgruppe und der Ischämiegruppe < 10% sowie die Ischämiegruppe > 30% gegenüber der Ischämiegruppe < 10% signifikant voneinander unterscheiden.

Zum Zeitpunkt 180 Minuten gab es statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.



Abb. 30: Darstellung des Laser-Doppler-Flux in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen. Ischämietiefe < 10% mit * p < 0,05 vs. -60, 150, 180, 240 und 300 Min., $\Omega p < 0,05$ vs. 180 Min., Ischämietiefe < 30% und > 30% mit # p < 0,05 vs. -60, 150, 180, 240 und 300 Min., alle Ischämiegruppen mit ** p < 0,01 vs. Kontrollgruppe, Ischämietiefe < 30% mit \$ p < 0,05 vs. Kontroll- und Ischämietiefe < 10%, Ischämiegruppe > 30% mit \$ p < 0,05 vs. Ischämietiefe < 10%.

3.3.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Roller venös/arteriell

Roller venös

In der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% vom Ausgangswert war ein kontinuierlicher Anstieg in der Anzahl an venösen Rollern gegenüber allen anderen Gruppen über den gesamten Reperfusionszeitraum zu verzeichnen. In der Ischämiegruppe mit einer Durchblutungsabnahme < 10% vom Ausgangswert war nur ein kurzzeitiger Anstieg nach Ende der Ischämie zu erkennen. Danach stagnierte die Anzahl rollender Leukozyten auf einem höheren Niveau gegenüber der 2. Ischämiegruppe und der Kontrollgruppe.

Die geringste Anzahl an venösen Rollern verzeichneten wir in der Kontrollgruppe.

In der statistischen Auswertung zeigten sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen allen Ischämiegruppen und der Kontrollgruppe über alle Zeitpunkte zusammen.

Auch konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kontrollgruppe zu den einzelnen Zeitpunkten gefunden werden.

Innerhalb der Ischämiegruppe < 10% und der Gruppe > 10% und < 30% war die Anzahl an Rollern nicht unterschiedlich (p > 0,05)

In der 3. Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe > 30% war die erhöhte Anzahl der Roller gegenüber den Werten der Stabilisierungsphase und zu jedem Zeitpunkt der Reperfusionsphase signifikant.

Zu den Zeitpunkten 240 Min. und 300 Min. der Reperfusionsphase war die Anzahl rollender Leukozyten in der 3. Versuchsgruppe auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.



Abb. 31: Darstellung der Roller in venösen Gefäßen in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen, * p < 0.05 vs. -60 und -30 Min., # p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

Roller arteriell

Hier war nur ein minimaler Anstieg der Anzahl arterieller Roller zum Zeitpunkt 180 Min. der Reperfusionsphase in der 1. Versuchsgruppe mit einer Ischämietiefe < 10% des Ausgangswertes zu erkennen.

Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppe zu den einzelnen Zeitpunkten. Auch innerhalb der 3 Versuchsgruppen, sowie zu den einzelnen Zeitpunkten zwischen den Versuchsgruppen gab es statistisch keine statistisch signifikanten Unterschiede.



Abb. 32: Darstellung der Roller in arteriellen Gefäßen in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen.

3.3.5. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Sticker venös/arteriell

Sticker venös

In der Gruppe mit einer Ischämietiefe > 30% des Ausgangswertes zeigte sich zu Beginn der Reperfusion eine erhöhte Anzahl von am venösen Gefäßendothel fest anheftender Leukozyten. Diese Adhärenz nimmt aber im Verlauf kontinuierlich ab und erreicht zum Versuchsende hin dann das Niveau der Kontrollgruppe. In den beiden anderen Versuchsgruppen konnten kaum Leukozytenadhärenzen festgestellt werden.

Statistisch gibt es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen 4 Versuchsgruppen sowie zu den einzelnen Zeitpunkten zwischen den Versuchsgruppen.



Abb. 33: Darstellung der Sticker in venösen Gefäßen in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen.

Sticker arteriell

Auch bei an arteriellen Gefäßen fest anheftenden Leukozyten zeigten sich statistisch keine signifikanten Unterschiede.



Abb. 34: Darstellung der Sticker in arteriellen Gefäßen in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen.

3.3.6. Kapillardichte

Die folgende Abbildung veranschaulicht den Verlauf der Kapillardichte der Kontroll- gegen alle 3 Versuchsgruppen. In keiner der 3 Versuchsgruppen erholt sich die Kapillardichte nach Beendigung der Karotisokklusion wieder. Während in der

Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme < 10% des Ausgangswertes die funktionelle Kapillardichte zum Ende der Reperfusionszeit wieder leicht abnimmt, hält sie sich in der 2. Versuchsgruppe über die gesamte Reperfusionszeit auf dem gleichen aber gegenüber der Stabilisierungsphase deutlich erniedrigten Niveau wie am Ende der Ischämiephase. In der 3. Ischämiegruppe kommt es tendenziell zu einem geringen Anstieg der Kapillardichte zum Ende der Reperfusionsphase.

In der Kontrollgruppe kommt es zum Versuchsende hin zu einem leichten Abfall der funktionellen Kapillardichte.

Statistisch kam es innerhalb der Kontrollgruppe nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

In den Versuchsgruppen mit einer Ischämietiefe < 10% und < 30% des Ausgangswertes unterscheiden sich die Werte der Stabilisierungsphase jeweils von allen Werten der Ischämieund Reperfusionsphase signifikant.

In der Versuchsgruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% des Ausgangswertes unterscheiden sich die Werte der Stabilisierungsphase gegenüber den Werten der Zeitpunkte 60 Min. und 120 Min. der Ischämiephase sowie gegenüber allen Werten der Reperfusionsphase signifikant voneinander.

Zu den Versuchszeitpunkten 5 Min. und 60 Min. der Ischämiephase unterscheiden sich die Werte der Kontrollgruppe signifikant von denen der 1. und 2. Versuchsgruppe.

Zum Zeitpunkt 120 Min. der Ischämiephase unterscheidet sich die Kontrollgruppe signifikant von allen 3 Ischämiegruppen sowie die Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% von der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme < 10%.

Zum Zeitpunkt 150 Min. der Reperfusionsphase unterscheidet sich die Kontrollgruppe von allen 3 Ischämiegruppen und die Gruppe mit Durchblutungsabnahme > 30% von den beiden anderen Ischämiegruppen signifikant voneinander.

Zu den Zeitpunkten 180 Min., 240 Min. und 300 Min. der Reperfusionsphase unterscheidet sich die Kontrollgruppe und die Gruppe mit Durchblutungsabnahme > 30% signifikant von den beiden tiefen Ischämiegruppen.



Abb. 35: Darstellung der Kapillardichte in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen, Ischämietiefe < 10% und < 30% mit * p < 0,05 vs. -60 Min., Ischämietiefe > 30% mit \$ p < 0,05 vs. - 60 Min., Ischämietiefe <10% und <30% mit \$ p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, Ischämiegruppen mit ## p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, Ischämietiefe < 10% mit § p < 0,05 vs. Ischämiegruppe > 30%, Ischämietiefe < 10% und < 30% mit & p < 0,05 vs. Ischämietiefe > 30%, Ischämietiefe < 10% mit $\neq p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe uns Ischämietiefe > 30%.

3.3.7. Plugger Kapillargebiet

Hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und allen 3 Ischämiegruppen hinsichtlich der Anzahl Kapillaren kurzzeitig verlegenden Leukozyten (p > 0,05).



Abb. 36: Darstellung der Plugger im Kapillargebiet in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen.

3.3.8. Sticker Kapillargebiet

Das geringfügig häufigere Auftreten von Stickern in der Reperfusionsphase im Kapillargebiet in der Gruppe mit Durchblutungsabnahme < 10% ist statistisch nicht signifikant. In den übrigen Gruppen konnten auch keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden.



Abb. 37: Darstellung der Sticker im Kapillargebiet in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen.

3.3.9. Perfundierte Venolen Kapillargebiet

In der Abbildung erkennt man eine deutlichere Abnahme der Anzahl perfundierter Venolen im Kapillargebiet in den Gruppen mit Durchblutungsabnahme < 10% und einer < 10% und < 30% gegenüber der 3. Gruppe und der Kontrollgruppe. In der Reperfusionsphase ist die Zunahme der Anzahl perfundierter Venolen in der Gruppe mit Durchblutung < 10% zeitlich schneller als in der Gruppe > 10% und < 30% und erreicht fast das Ausgangsniveau wieder. Statistisch zeigte sich keine Signifikanz in der Kontrollgruppe zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. In der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme < 10% unterscheidet sich die Ischämiephase signifikant gegenüber der Stabilisierungs- und der Reperfusionsphase.

Bei den Versuchstieren mit einer Durchblutungsabnahme > 10% und < 30% unterschiedet sich die Stabilisierungsphase signifikant von den Zeitpunkten 60 Min. und 120 Min. der

Ischämiephase und dem Zeitpunkt 150 Min. der Reperfusionsphase, außerdem unterscheiden sich die Ischämiezeitpunkte 60 Min. und 120 Min. von den Reperfusionszeitpunkten 240 Min. und 300 Min. der Reperfusionsphase.

In der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% des Ausgangswertes zeigten sich statistisch keine signifikanten Unterschiede.

Zu den Ischämiezeitpunkten 5, 60 und 120 Min. unterscheidet sich die Gruppe mit Durchblutungsabfall < 10% von der Kontrollgruppe signifikant. Zum Ischämiezeitpunkt 60 Min. und 120 Min. der Ischämiephase unterscheiden sich die Kontroll- und Gruppe > 30%jeweils statistisch signifikant von den übrigen beiden Gruppen.

Zum Reperfusionszeitpunkt 150 Min. unterscheidet sich die Kontrollgruppe von der Gruppe mit Durchblutungsabfall < 10% und Der Gruppe > 10% und < 30% statistisch signifikant, ebenso die Gruppe > 30% von der Gruppe > 10% und < 30% und die Gruppe mit einer Durchblutung > 10% und < 30% von der Gruppe < 10% voneinander.



Abb. 38: Darstellung der perfundierten Venolen in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen, Ischämietiefe < 10% mit * p < 0,05 vs. – 60 Min. und Reperfusionsphase, Ischämietiefe < 30% mit #p < 0,05 vs. – 60 Min., \$p < 0,05 vs. 240 und 300 Min., Ischämietiefe < 10% mit $\Diamond p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, Kontroll – und Ischämiegruppe > 30% mit $\Omega p < 0,05$ vs. Ischämiegruppe < 10% und Ischämiegruppe < 30%, Kontrollgruppe mit & p < 0,05v vs. Ischämietiefe < 10% und Ischämietiefe < 30%.

3.3.10. Blut-Hirnschranke

Es gibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Ischämiegruppe mit einer Durchblutung < 10% des Ausgangswertes hinsichtlich der Veränderungen eines generalisierten Defektes der Blut-Hirnschranke (p < 0.05).

Bei der Korrelation zwischen der Intaktheit der Blut-Hirnschranke gegen Ischämietiefe zeigte sich keine signifikante Korrelation. Auch bei der Korrelation zwischen einem generalisierten Defekt der Blut-Hirnschranke gegen die Ischämietiefe fanden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen.



Abb. 39: Zustand der Blut-Hirnschranke in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen, generalisierter Defekt der Bluthirnschranke mit * p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.3.11. Neuroscore

Hier ist der Verlauf der Werte des Neuroscores in Prozent zum Ausgangswert mit Aufteilung der Ischämiegruppe in die 3 Untergruppen. Die Kurve der Gruppe mit einer Durchblutung < 10% fällt über den gesamten Beobachtungszeitraum ab, während in der Gruppe mit einer Durchblutung >10 % und < 30% sich die Werte ab dem 2. Tag auf gleichem Niveau einzupendeln scheinen. Die Gruppe mit einer Durchblutung > 30% steigt im Neuroscorewert zum Ende der Beobachtungsphase tendenziell wieder an.

In der statistischen Auswertung gibt es innerhalb der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied an den einzelnen Untersuchungstagen. In allen drei Ischämiegruppen zeigen sich hingegen signifikante Unterschiede zwischen dem Untersuchungstag 0 und allen übrigen Untersuchungstagen. Ab dem 2. Untersuchungstag sind die Unterschiede im Neuroscore zwischen der Kontroll- und der Gruppe mit einer Durchblutung < 10% ebenfalls signifikant.



Abb. 40: Verlauf des Neuroscores in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen in der postischämischen Beobachtungsphase, alle Ischämiegruppen mit * p < 0,05 vs. Tag 0, Ischämietiefe < 10% mit $\Omega p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

3.3.12. Körpergewicht

Aus dem graphischen Verlauf des Körpergewichtes der Kontroll- und den einzelnen Ischämiegruppen zeigt sich, dass es in allen Gruppen zu einer Abnahme des Körpergewichtes kommt. In keiner der 4 Versuchsgruppen wird das Ausgangsgewicht wieder erreicht. Tendenziell erkennt man, dass die Tiere der Gruppe mit einer Durchblutung < 10% stetig an Gewicht verlieren während es in den anderen Ischämiegruppen zum Ende der postischämischen Beobachtungstage zu einer Zunahme an Körpergewicht kommt. Statistisch zeigt sich, dass in der Kontroll – und allen Ischämiegruppen das Körpergewicht an den Tagen 1-4 signifikant niedriger ist gegenüber Tag 0.

An Tag 4 unterschiedet sich die Gruppe mit einer Durchblutung < 10% von allen anderen Gruppen signifikant.



Abb. 41: Graphischer Verlauf des Körpergewichtes in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen in der postischämischen Beobachtungsphase. * p < 0.05 vs. Kontrollgruppe und alle 3 Ischämiegruppen, \$ p < 0.05 vs. Kontroll- und den übrigen 2 Ischämiegruppen.

3.3.13. Infarktvolumen

Der histologische Schnitt in Abbildung 41 zeigt das typische Bild eines rechtsseitigen Infarktes nach 2-stündiger Ischämie.



Abb. 42: Histologische Darstellung eines rechtsseitigen Infarktes nach 2-stündiger fokaler Ischämie.

In der Grafik erkennt man, dass das gemessene Infarktvolumen in der Gruppe mit einer Durchblutung < 10% und einer Durchblutung > 10% und < 30% mit ca. 40% des Volumens der ipsilateralen Hemisphäre deutlich größer ist gegenüber der 3. Ischämie- und der Kontrollgruppe.

Dabei war der statistische Unterschied zwischen der Kontroll- und den beiden oben erstgenannten Ischämiegruppen signifikant. Außerdem war das Infarktvolumen in der Gruppe mit einer Durchblutung < 10 % statistisch signifikant erhöht gegenüber der Gruppe mit einer Durchblutung > 30%.



Abb. 43: Infarktvolumen in % der ipsilateralen Hemisphäre in der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen, * p < 0.05 vs. Kontrollgruppe, Ischämiegruppe > 30% mit # p < 0.05 vs. Ischämiegruppe < 10%.

3.3.14. Überleben

Man erkennt, dass es in den Ischämiegruppen zu einem Versterben der Tiere schon ab dem 1. postischämischen Tag kommt. Am Ende leben in der Gruppe mit einer Durchblutung < 10% und einer Durchblutung > 10% und < 30% mit ca. 60% die wenigsten Tiere. In der Gruppe mit einer Durchblutung > 30% leben noch knapp 80% der Tiere. In der Kontrollgruppe leben mit fast 90% noch die meisten Versuchstiere. Statistisch zeigen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebenszeit zwischen der Kontroll- sowie allen Ischämiegruppen.



Abb. 44: Überleben der Tiere der Kontroll- und den 3 Ischämiegruppen nach Ende des Akutversuches.
3.4. Zielparameter - Versuchsgruppe ,Späte Reperfusion'

3.4.1. Arterielle Gefäßdurchmesser

Hier sind die Durchmesser der Arteriolen in den untersuchten Tieren aufgezeichnet. Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und den einzelnen Reperfusionsgruppen.



Zeit nach Ischämie

Abb. 45: Darstellung der Gefäßdurchmesser der Arteriolen der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen.

3.4.2. Venöse Gefäßdurchmesser

Auch die Durchmesser der Venolen zeigten statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.



Abb. 46: Darstellung der Gefäßdurchmesser der Venolen der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen.

3.4.3. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Roller venös

Dargestellt sind die venösen Roller der einzelnen Reperfusionsgruppen gegen die Kontrollgruppe. Die Anzahl rollender Leukozyten in venösen Gefäßen ist in den Gruppen 12h und 24h sowie 72h und 96h signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.



Abb. 47: Darstellung der Roller in venösen Gefäßen der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen, Versuchsgruppen 12h, 24h, 72h und 96h mit * p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.4.4. Leukozyten-Endothelinteraktionen – Sticker venös

Dargestellt sind hier an venösen Gefäßwänden fest anheftenden Leukozyten. Deren Anzahl ist signifikant in allen 5 Versuchsgruppen der späten Reperfusionsphase gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.



Abb. 48: Darstellung der Sticker in venösen Gefäßen der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen, alle Versuchsgruppen mit * p < 0.05 vs. Kontrollgruppe.

3.4.5. Kapillardichte

Die Kapillardichte zeigte zu allen Zeitpunkten und in allen Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.



Abb. 49: Darstellung der Kapillardichte der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen.

3.4.6. Perfundierte Venolen Kapillargebiet

In dieser Darstellung wurde die Anzahl perfundierter Venolen in Prozent des Ausgangswertes, also zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, gegen die Anzahl am Ende der Aufnahmen abgebildet. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich dabei nicht.



Zeit nach Ischämie

Abb. 50: Darstellung der perfundierten Venolen im Kapillargebiet der Kontrollgruppe und den nach der Reperfusionszeit unterteilten Ischämiegruppen in Prozent vom Ausgangswert.

4. Diskussion

Es ist zu erkennen, dass die in den experimentellen Versuchen gewonnenen Ergebnisse vielschichtig sind. Die Deutung und Übertragung auf die Klinik soll in der Diskussion erörtert werden.

4.1. Methodik

4.1.1. Das experimentelle Modell

In der Literatur werden verschieden Modelle beschrieben, die die klinische Manifestation einer zerebralen Ischämie untersuchen [76]. Die akute fokale zerebrale Ischämie, die dem Schlaganfall zugrunde liegt, ist wohl klinisch die relevanteste Manifestation für den Menschen. Die Ursache für eine fokale zerebrale Ischämie liegt meist in einer Stenosierung oder einem Verschluss einer oder mehrerer Hirnarterien, meistens der A. cerebri media. Im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes kommt es innerhalb von wenigen Minuten durch die Ischämie zu einem Gewebeuntergang, dem Infarkt [112]. Hier liegt die Restdurchblutung durch Kollateralversorgung bei unter 10% des Ausgangswertes [104]. Für das betroffene Gebiet bedeutet dies einen Blutfluss von nur noch ca. 12-15 ml/100g/min. Um dieses Gewebe herum befindet sich die Penumbra, ein Bereich, in dem der erniedrigte Blutfluss zwar zum Sistieren der elektrischen Aktivität der Neurone führt aber das Membranpotential der Nervenzellen erhalten ist. Hier beträgt die Restdurchblutung ca. 25-50% vom Ausgangswert. [93].

Dieses Gewebe kann, im Gegensatz zum Gewebe im Infarkt selbst vor dem Untergang bewahrt werden, selbst wenn es erst nach einigen Stunden (2-4 Stunden) zu einer Erholung der Durchblutung kommt [104] [93]. Hält die Durchblutungsstörung aber weiterhin an, geht auch das Nervengewebe in der Penumbra unter [81].

Durch den reduzierten Blutfluss kann das von den noch aktiven Nervenzellen weiterhin verbrauchte ATP nicht wieder synthetisiert werden. Die Folge ist ein Mangel an ATP, eine Lactatacidose und ein Verlust der Ionenhämostase der Nervenzellen. Es folgt eine festgelegte, multimodale und multizelluläre Kaskade [16] [29]. Es kommt zur Freisetzung von Neurotransmittern, vor allem des exzitatorischen Glutamat, deren Wiederaufnahme durch den Energiemangel gestört bleibt. Glutamat bindet an N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolproprionsäure-Rezeptoren (AMPA), was zu einem

starken Einstrom von Calcium führt. Dieser Einstrom führt wiederum zu einer Aktivierung von Phospholipasen und Proteasen, die dann Zellmembranen und Proteine zerstören. Außerdem vermitteln Glutamatrezeptoren einen massiven Natrium- und Wassereinstrom mit daraus resultierenden Zellschwellungen, Zellödem und Abnahme des Extrazellulärraums [67]. Ein gleichzeitig ablaufender Calciumeinstrom aktiviert ebenfalls Proteasen, Lipasen und Nukleasen. Die auftretenden hohen Konzentrationen von Calcium, Natrium und ADP verursachen eine hohe Produktion von Sauerstoffradikalen, sowohl in Mitochondrien, als auch bei der Prostaglandinsynthese und dem Abbau von Hypoxanthin. Diese Sauerstoffradikale zerstören Lipide, Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate. Neben der Produktion von Sauerstoffradikalen werden u.a. auch die Lipoxygenase-Kaskade [83], die poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) [62] aktiviert, die auch zu einer Störung der Ionenhämostase führen und schließlich zum Absterben der Neurone [87].

Vermutlich durch die erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentration und das freigesetzte Glutamat kommt es zu *cortical spreading depressions* (CSD). Diese führen unter anderem auch zur Störung der Ionenhämostase und Zellschwellungen [32].

Außerdem konnte u.a. Shin et al. zeigen, dass durch die den CSD nachfolgenden Vasokonstriktionen es zu einer Zunahme des Infarktvolumens kam [94]. Dies geschieht nach Dreier et al. aufgrund einer Oligämie während der Ischämie, obwohl CSD bei einem nichtischämischen Zustand eher eine Hyperämie bedingen [32].

Neben diesen im Infarktgebiet stattfindenden Prozessen kommt es auch zu einer Aktivierung des peripheren Immunsystems. Diese dauert Tage bis Wochen und bedingt ein Auftreten von Entzündungszellen [51]. Dem ortsständigen zerebralem Immunsystem, der Mikroglia, kommt ebenso eine wichtige Rolle direkt vor Ort zu. Sie überwacht das Hirngewebe und reagiert auf Veränderungen, zum Beispiel durch Steigerung der Makrophagenfunktion, der Sekretion von Zytokinen und der Antigenpräsentation [48]. Nach einer Ischämie kommt es innerhalb von Minuten zu einer Aktivierung der Mikroglia und diese akkumuliert sowohl in der eigentlichen Läsion, als auch in der Penumbra [4]. Dabei kommt es 48 – 72 Stunden nach Beginn einer fokalen zerebralen Ischämie zu einem Peak und hält für Wochen an. Dabei kann sie nach Aktivierung neben Sauerstoff- und Stickstoffradikalen auch Antigene präsentieren [88].

Barone et al. stellten fest, dass eine zerebrale Ischämie zum Auftreten von Entzündungszellen im Infarktgebiet führt [5]. Dies wiederum führt zur Aktivierung von Endothelzellen, Makrophagen und Astrozyten [29], die zusammen mit Entzündungszellen die Ausschüttung von TNF- α und IL-1 aus dem ischämischen Gewebe stimulieren [19]. Dadurch kommt es zur Exprimierung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen, die eine Rekrutierung von Leukozyten und Plättchen in das Ischämiegebiet vermitteln [19]. Dies führt in diesem Gebiet zu Leukozytenrollen und – anheften am Gefäßendothel [77]. Die schrittweise ablaufenden Prozesse beginnen zunächst mit dem P-Selectin vermittelten Leukozytenrollen. Dabei verbindet sich das P-Selectin auf den Endothelzellen mit der Sialylkette auf den Leukozyten [52], wohingegen das danach stattfindende feste Anheften der Leukozyten durch die Verbindung von
ß2-Integrinen auf Leukozyten mit ICAM-1 auf den zerebralen Endothelzellen vermittelt wird [68]. Ob die Leukozyten direkt oder indirekt, durch Freisetzen von Sauerstoffradikalen, Proteasen und Entzündungsmediatoren, an der Infarktentstehung beteiligt sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Für beide Varianten gibt es wissenschaftliche Belege [101] [61]. Kommt es zu einer Reperfusion des zuvor nichtdurchbluteten Hirngewebes, ist dies zum einen überlebenswichtig für das bisher noch nicht betroffene Gewebe und Zellen, die unempfindlicher gegen eine Minderdurchblutung sind. Allerdings gibt es seit einigen Jahren deutliche Hinweise dafür, dass eine Reperfusion auch zu weiterem Schaden am Gewebe führen kann. So kommt es auch durch die Reperfusion selber zu einer Dysfunktion der Endothelzellen mit Zellschwellung, Verlust von Pinocytosevesikeln, Abheben der Endothelzellen von der darunterliegenden Basalmembran und Anheften von aktivierten Leukozyten an die Leukozytenoberfläche [18].

4.1.2. Versuchstiere

Für die Ischämieforschung ist die Verwendung der richtigen Versuchstiere essentiell zur Bewertung der erzielten Ergebnisse und Effekte einer therapeutischen Therapie zur Anwendung beim Menschen. Neben Gerbilen werden Ratten und Mäuse am häufigsten verwendet. Sie alle zeichnen sich, aufgrund von Inzucht, durch eine große Homogenität aus und zeigen große genetische Homologien zu höheren Säugetieren. Auch große Ähnlichkeiten in der neuroanatomischen Entwicklung sowie dem Vorhandensein eine Gefäßversorgung des Gehirns durch 4 Arterien macht sie für die Forschung interessant. Dabei muss bedacht werden, dass bei einem fokalen Ischämiemodell, wie zum Beispiel bei einem Modell mit Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO = middle cerebral artery occlusion), eine Reduktion der Durchblutung sowohl im Striatum als auch im Cortex resultiert, aber das Ausmaß des Durchblutungsabfalls als auch dessen Verteilung im betroffenen Gebiet sind sowohl von der Dauer des Gefäßverschlusses, der Stelle, an dem die Okklusion erfolgt, als auch von der Kollateralversorgung im Versorgungsgebiet abhängig [103]. Durch die Benutzung von Operationsmikroskopen können auch an diesen Kleintieren mikrochirurgische Präparationen vorgenommen werden.

Die oben beschriebenen Experimente wurden an Mongolischen Wüstenrennmäusen

(Ordnung: Rodentia, Familie: Muridae, Genus: Meriones, Spezies: unguiculatus), kurz Gerbil, durchgeführt. Aufgrund der folgenden Punkte sind Gerbile für die Ischämieforschung von Vorteil:

 Der Circulus arteriosus Willisii dieser Tiere zeigt wichtige anatomische Besonderheiten. Zum einen gibt es keine Aa. communicantes posteriores und damit keine Verbindung zwischen den beiden Vertebralarterien und den beiden Aa. carotidis internae [33] [41]. Außerdem sind in 30 - 40% der Tiere auch die Aa. communicantes anterior nicht vorhanden.

Somit resultiert aus dem Verschluss einer A. carotis interna eine ischämische Läsion der ipsilateralen Hemisphäre.

2. Eine dünne Dura mater und ein schmaler Subarachnoidalraum ermöglichen die Beobachtung der Hirnoberfläche mittels Intravitalmikroskopie nach Entfernen der Schädelkalotte. So kann die Mikrozirkulation ohne traumatische Eröffnung der Dura mater und der damit verbundenen Aktivierung von Leukozyten [84] über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Außerdem erlaubt eine nicht-eröffnete Dura mater ein längeres Überleben ohne Infektion nach Ende der Akutphase und damit eine Beobachtung über mehrere Tage.

Die oben beschriebenen Versuche sollten Veränderungen in der zerebralen Mikrozirkulation, die Leukozytenendothelinteraktionen in den zerebralen Gefäßen, die Beeinträchtigung der Bluthirnschranke sowie die Makro- und Mikrohämodynamik des Gehirns untersuchen. Diese Parameter können nur an einem lebenden Versuchstier untersucht werden.

4.1.3. Dauer der Ischämie

Während der Ischämiephase des Versuches wurde durch einen Verschluss der rechten A. carotis die Durchblutung der durch diese Arterie versorgten Hemisphäre reduziert.

In Experimenten mit beidseitiger Karotisokklusion konnte an Gerbilen gezeigt werden, dass sich nach einer Ischämiedauer von 3 Minuten bereits histologisch messbare Verluste an Nervenzellen zeigen [57]. Jones et al. zeigten bereits 1981 in einer Versuchsreihe mit fokaler zerebraler Ischämie an wachen Affen, dass nach einer Ischämiedauer von 15-30 Minuten mikroskopisch erkennbare Infarkte zeigten, bei einer Ischämiedauer von 2-3 Stunden hingegen die Infarkte deutlich größer waren [56]. Bei Versuchen mit längeren Ischämiephasen konnten Weber et al. einen Zusammenhang zwischen Nervenzelluntergang und dem Überleben der Versuchstiere herstellen [109].

Somit war mit der von uns gewählten Ischämiedauer von 2 Stunden zum einen die Voraussetzung geschaffen, dass es zu einer messbaren Infarktentstehung kommen kann und zum anderen, dass die Versuchstiere den Akutversuch überleben, um dann in der 4-tägigen Beobachtungsphase neurologisch untersucht werden zu können.

Bezogen auf den Alltag spiegelt das für diese Versuche gewählte Zeitfenster in etwa die Zeit wieder, die es dauert, bis eine Therapie nach Einsetzen der ersten Symptome eines Schlaganfalls beginnt.

4.1.4. Intravitalmikroskopie der zerebralen Mikrozirkulation

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte in diesem Modell zerebrale Mikrozirkulation in Arteriolen, Venolen, Kapillaren und auch die Bluthirnschranke vor, während und nach der Induktion einer 2-stündigen fokalen zerebralen Ischämie untersucht werden. Außerdem konnte untersucht werden, inwieweit es durch die Induktion einer solchen Ischämie zu einer Aktivierung von Leukozyten in der Reperfusionsphase kommt. Durch das 4-tägige Überleben der Tiere nach Ende des Akutversuches und der täglichen neurologischen Untersuchung war es möglich, die im Akutversuch gewonnen Messergebnisse mit diesen Untersuchungsergebnissen in Bezug zu setzten. Dadurch, dass in einer weiteren Versuchsreihe bei gleichem Versuchsaufbau und – ablauf die intravitalmikroskopischen Aufnahmen 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Ende der 2-stündigen Ischämiephase durchgeführt wurden, konnte zudem untersucht werden, inwieweit es zu einer zeitverzögerten Aktivierung von Leukozyten kommt.

In der Literatur finden sich viele Untersuchungen zu dem oben genannten Themenkomplex. So zeigten Ishikawa et al., dass es nach Induktion einer Ischämie bereits nach einigen Minuten Reperfusion zu einer Ansammlung von adhärenten Leukozyten in den venösen Gefäßen kam und nach ca. 4 Stunden Reperfusion der Höchstwert erreicht wurde [53]. Ritter et al. zeigten an einem Fadenmodell an Ratten, dass es zu einem signifikanten Leukozytenrollen und –sticken in Venolen in der frühen Reperfusion kommt und vermuten, dass diese Leukozyten die Gefäße und umgebenden Hirnzellen schädigen und es so zu einer entzündlichen Reaktion kommt [90]. Auch Jin et al. vermuteten, dass es zu einem direkten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem infarzierten Hirngewebe kommt [55]. Dafür wäre ein Auswandern der Leukozyten aus den Gefäßen aber notwendig. Barone et al. zeigten 1995 an einem Rattenmodell, dass die Rekrutierung von Leukozyten über mehrere Tage anhält. In der intravitalmikroskopischen und immunhistochemischen Arbeit von Herrmann et al. wurde eine Akkumulation von Leukozyten im Hirnparenchym nachgewiesen [50].

Eine Arbeit von Enzmann et al. zeigte ebenfalls, dass es zu einem frühen Auftreten von Leukozyten nach einer transienten fokalen Ischämie bei der Maus und beim Menschen kommt, allerdings konnten sie kein Auswandern von Leukozyten in das infarzierte Hirngewebe feststellen.

Die Methode der Intravitalmikroskopie erlaubt die Darstellung und das Sichtbarmachen des mikrovaskulären Systems. Damit kann die regionale Durchblutung und die Vasomotorik zu verschieden Zeitpunkten quantitativ untersucht werden. Auch eine Differenzierung zwischen Rollern und Stickern ist hiermit möglich [97]. Dabei sind Roller am Gefäßendothel entlangrollende und Sticker dem Gefäßendothel fest anheftende Leukozyten.

Auch die Bestimmung der Kapillardichte und eine Beurteilung der Integrität oder Schädigung der Bluthirnschranke kann über den gesamten Zeitraum des Versuches untersucht werden.

Die ersten in vivo Untersuchungen des Hirnkreislaufs mit einem geschlossenen Schädelfenster sollen 1811 von Ravina an Hunden (84) durchgeführt worden sein. Später folgten Untersuchungen u.a. an Affen, Katzen, Kaninchen, Ratten und Mäusen [58]. Dabei konnte die Hirnoberfläche mit Durch- oder Auflicht beobachtet werden. So konnte Meyer et al. bereits 1958 eine Aktivierung von Leukozyten mit Schädigung der Blut-Hirnschranke qualitativ beschreiben [73]. Mittels Durchlichttechnik beobachtete Yamakawa et al. 1987 [113] bei Katzen mit hämorrhagischer Hypotension das Verhalten von weißen Blutzellen. Allerdings führte die in den Kortex eingeführte Lichtquelle zur Verletzung des Hirngewebes mit Eröffnen der Blut-Hirnschranke, Mikroblutungen und vermehrter Wärmeproduktion. Unter Verwendung der Auflichtmikroskopie konnten diese Komplikationen umgangen werden.

Auch durch die Verwendung eines geschlossenen Schädelfensters konnte eine Herniation von Hirngewebe und eine Verletzung der Dura mater mit nachfolgender Aktivierung von Leukozyten vermieden werden. Schon eine geringfügige Verletzung der Dura mater zeigte in einigen Versuchen vermehrte Leukozyten-Endothelinteraktionen [49]. Durch den Verschluss der Kopfhaut am Ende der Reperfusionsphase wurde die Infektionsgefahr vermindert.

Für die Messung der mikrovaskulären Perfusion und zur Beobachtung des Ablaufes der Leukozyten-Endothelinteraktionen ist die Fluoreszenzmikroskopie gut geeignet. Zur Darstellung des Intravasalraums wurde hochmolekulares und mit Fluoreszein markiertes Dextran (MW: 150.000 u) infundiert. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes des von uns verwendeten Dextrans konnte die von Steinbauer et al. beschriebenen Nebenwirkungen auf die Blutviskosität, die Leukozyten-Endothelinteraktion und die Kapillardichte vermindert werden [98].

Die in vivo Fluoreszenzmarkierung von Leukozyten durch während des Versuches intravenös verabreichtes Rhodamin 6G umgeht die beschriebene extrakorporale Aktivierung von ex vivo markierten Leukozyten [47] und Veränderungen der rheologischen Eigenschaften [60] [79]. Durch die in diesen Versuchen verwendete Dosis ist von einer guten Anfärbung der Leukozyten auszugehen [3].

Da während der langen Gesamtversuchsdauer ein Verlust des Indikators Rhodamin 6G verhindert werden sollte, waren wiederholte Gaben notwendig. Um phototoxische Nebenwirkungen auf die Hirnoberfläche zu vermeiden, wurde die Fluoreszenzlichtexposition auf 30 s pro Messgebiet eingeschränkt [89]. Zusätzlich konnte durch die Verwendung des computergesteuerten Mikrometertisches, ein schnelles und sehr genaues Wiederfinden der zu untersuchenden Gebiete ohne Lichtexposition erfolgen. Die Verwendung einer SITS-Restlichtkamera ermöglichte eine Anregungsbeleuchtung mit geringer Intensität und verhinderte eine photochemische Störung der Blut-Hirnschranke.

Wir untersuchten Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser unter $< 50 \mu m$, da die eingeschränkte Tiefenschärfe des optischen Systems in Gefäßen mit größerem Durchmesser die Auszählung der Leukozyten erschwerte.

Die Anzahl rollender und fest adhärenter Leukozyten am Gefäßendothel wurde pro Minute angegeben und bezieht sich jeweils auf einen Gefäßabschnitt von 100 µm Länge.

4.1.5. Quantifizierung der zerebralen Durchblutung

Wir verwendeten zur Messung der zerebralen Durchblutung die Laser-Doppler-Fluxmetrie. Bereits 1980 haben Williams et al. gezeigt, dass mit der Laser-Doppler-Fluxmetrie die regionale Durchblutung mit guter zeitlicher und räumlicher Auflösung bestimmt werden kann [110]. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Sonde durch ihre Platzierung auf der Dura mater oder, wie in unseren Versuchen, auf der Schädelkalotte, das Hirnparenchym nicht verletzt und die Durchblutung nicht beeinträchtigt.

Die Messung der zerebralen Mikrozirkulation bleibt allerdings, aufgrund der begrenzten Eindringtiefe des Lasers von 1,5 mm, auf die Hirnoberfläche beschränkt. Da der Doppler-Effekt nur bei Hirngefäßen mit einem Durchmesser $< 200 \,\mu\text{m}$ Gültigkeit hat, wählten wir Gefäße mit deutlich kleineren Durchmessern [13].

In Versuchen an Ratten mit fokaler zerebraler Ischämie konnten Dirnagel et al. eine enge Korrelation zwischen der Laser-Doppler-Fluxmetrie und der, mittels Autoradiographie gemessenen, Durchblutung im Gehirn festgestellt werden, sodass Rückschlüsse auf die Durchblutung in ml/100g Gewebe*min gemacht werden können [30].

Auch die Intravitalmikroskopie kann zur Beurteilung der Gehirndurchblutung herangezogen werden. Mittels Messung des Gefäßdurchmessers und der Messung der Strömungsgeschwindigkeit von Thrombozyten kann die Perfusion eines Gefäßes erfasst werden. In unseren Versuchen war die Qualität der Aufnahmen nicht ausreichend, um per Sequenzanalyse von aufgezeichneten Videobildern die Strömungsgeschwindigkeit zu messen. Für die durchgeführten Untersuchungen war die Laser-Doppler-Fluxmetrie zusammen mit der Intravitalmikroskopie eine gute Methode zur Messung der regionalen Hirndurchblutung [9]

4.1.6. Neurologische Untersuchung und Histologie

Mit unserem o.g. Protokoll konnte in einfacher Art und Weise die Funktionstüchtigkeit der verschiedenen anatomischen Strukturen mit ihren afferenten und efferenten Verbindungen überprüft werden [105].

Die Prüfung des Greif- und des Fallreflexes gibt Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des motorischen Kortex. Eine normale Spontanaktivität deutet auf einen intakten Hippocampus hin [42], während Circling oder ein inkorrektes Umdrehen aus der Rückenlage auf eine Hemiparese hinweisen können. Das Nagen an Pappe lässt Rückschlüsse auf die Integrität des Zentralnervensystems zu.

Da es nach dem eigentlichen Infarktgeschehen durch die Ausbildung eines ischämischen Hirnödems zur Beeinflussung tieferer Strukturen kommen kann [102], wurden durch die o.g. Tests auch diese Strukturen in die neurologische Untersuchung miteinbezogen.

Da schon Lipton 1999 auf den verzögerten neuronalen Zelltod nach Ischämie hinwies und auch in neueren Studien dieses Phänomen bestätigt wurde, wurden die Gehirne der Versuchstiere am 4. Tag entnommen und anschließend histologisch untersucht, um einen messbaren Schaden am Gehirn mikroskopisch erkennen zu können [67] [67] [92].

Um die histologische Qualität der Schnitte im Vergleich zur Immersionsfixation zu erhöhen, wurden die Gehirn nach dem von Brown und Brierley 1968 beschriebenen Verfahren in Paraformaldehyd perfusionsfixiert. Die so fixierten Gehirne wurde dann in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und mit HE gefärbt [15].

Mit Hilfe der digitalen Planimetrie konnte das Infarktvolumen in der betroffenen Hemisphäre sicher und genau ausgemessen werden.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Kontrollparameter

Es wurde ein kurzzeitiger Anstieg des Blutdrucks nach Induktion der Ischämie gefunden. Dieser war nach 5 Minuten signifikant erhöht. An den beiden folgenden Ischämiezeitpunkten sowie zum Reperfusionszeitpunkt 300 Min. war der mittlere arterielle Blutdruck hingegen signifikant erniedrigt gegenüber der Stabilisierungsphase. Während der übrigen Versuchszeit blieb der Blutdruck in beiden Gruppen stabil.

Inwieweit die Ischämietiefe Einfluss auf den Blutdruck hat, sollte durch die Aufteilung in die oben bereits beschrieben Ischämiegruppen aufgezeigt werden. In der Ischämiegruppe mit einer Ischämietiefe < 10% zeigte sich ein Anstieg des Blutdrucks kurz nach Induktion der Ischämie am deutlichsten und war statistisch signifikant.

Nach der Ischämiephase blieb der mittlere arterielle Blutdruck in allen Versuchsgruppen stabil, in der Gruppe mit einer Ischämietiefe < 10% allerdings auf höherem Niveau gegenüber den anderen Gruppen, wobei nur zum Zeitpunkt 150 Min. der mittlere arterielle Blutdruckwert statistisch signifikant erhöht war gegenüber den anderen Gruppen.

Wir führen diese Blutdruckveränderungen auf eine Reaktion der zerebralen Kreislaufzentren durch die starke Reduktion der zerebralen Durchblutung zurück.

Mattle et al. zeigten in ihrer klinischen Studie an Schlaganfallpatienten, dass ein niedriger mittlerer arterieller Blutdruck innerhalb der ersten 4 Stunden nach Symptombeginn zu einem milderen Infarkt und einem besseren Outcome der Patienten führt [72]. Auch in unseren Versuchsgruppen zeigte sich, dass Tiere mit einem erhöhten mittlerer arteriellen Blutdruckwert nach Beginn der Ischämie einen größeren Infarkt hatten und auch die Ergebnisse der neurologischen Untersuchung waren in dieser Gruppe signifikant schlechter.

Um den Einfluss der Narkose auf die systemischen Parameter der Tiere zu untersuchen, wurden in einer eigenen Versuchsreihe Blutgasanalysen an Kontroll- und Ischämietieren durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die gefundenen Veränderungen u.a. des pH-Wertes, der Blutglukose und der Leukozytenzahl keinen Einfluss auf Zielgrößen des Versuches hatten.

Der Abfall des Hämoglobins wird auf den operativ bedingten Blutverlust zurückgeführt und war in beiden Versuchsgruppen gleich ausgeprägt. Der Anstieg der Leukozytenzahl war sowohl in der Kontroll – als auch in der Ischämiegruppe gleich. Dieser Anstieg wird ebenfalls auf den operativen Eingriff zurückgeführt. Da sich keine erhöhte Leukozyten-Endothelinteraktion in der Kontrollgruppe zeigte, kann von einer vermehrten Interaktion am Gefäßendothel nur durch eine erhöhte Leukozytenanzahl im Blut, nicht ausgegangen werden.

4.2.2. Zerebrale Durchblutung

Nach einseitiger Unterbindung der A. carotis kam es zu einer fokalen zerebralen Ischämie auf der betroffenen Hemisphäre. Anhand der Laser-Doppler-Fluxmetrie konnte die Durchblutungsabnahme bestätigt werden. Dabei war die Durchblutungsabnahme nicht vorhersehbar und bei jedem Versuchstier unterschiedlich. Die Werte dieser Abnahme lagen zwischen 2% und 73% bezogen auf den Ausgangswert. Einen Nullwert in der Laser-Doppler-Fluxmetrie kann es aufgrund von Brow'schen Molekularbewegungen nicht geben, da diese Molekularbewegungen ein Doppler-Signal erzeugen.

Nach Beendigung der Durchblutungsunterbrechung kam es in der Ischämiegruppe zu einem deutlichen Anstieg. Dabei lag der Laser-Doppler-Fluxwert der Ischämiegruppe auf gleichem Niveau wie der Wert der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt und dieser lag ebenfalls etwas über dem Ausgangswert in der Stabilisierungsphase. Es folgte im Anschluss in der Ischämiegruppe eine geringe Abnahme der Laser-Doppler-Fluxmetriewerte, die dann in dieser Gruppe wieder leicht anstiegen und oberhalb des Ausgangswertes blieben.

Die Abnahme in der Ischämiephase war innerhalb der Ischämiegruppe und gegenüber den Werten der Kontrollgruppe statistisch signifikant.

Nach Unterteilung in die unterschiedlichen Ischämietiefen wurde deutlich, dass Tiere mit einer tiefen Ischämie, also die Versuchsgruppe mit einer Durchblutungsabnahme < 10% vom Ausgangswert, eine stärkere Hyperperfusion zum ersten Reperfusionszeitpunkt und am darauffolgenden Messzeitpunkt eine stärkere Hypoperfusion gegenüber den anderen Versuchsgruppen zeigten.

Mehrere Untersuchungen bei globaler zerebraler Ischämie [99] [75] zeigten eine deutliche postischämische Hyperperfusion, die von einer Hypoperfusion gefolgt war. Diese Hypoperfusion wird u.a. auf die Akkumulation vasodilatatorischer Substanzen mit Aufhebung der Autoregulation von Widerstandsgefäßen zurückgeführt [59]. Eine Hypoperfusion nach dem eigentlichen ischämischen Ereignis führt zu einer erneuten Hypoxie und Substratmangel im betroffenen Areal, das jedoch zu diesem Zeitpunkt einen erhöhten Bedarf an Sauerstoff hat [80]. Da eine suffiziente Reperfusion für das Überleben von Nervenzellen essentiell ist, führt eine insuffiziente Reperfusion nach Ende der eigentlichen Ischämie zu einem weiteren Absterben von Nervenzellen und somit zu einer Infarktausbreitung. Versuchstiere mit einer Durchblutungsabnahme < 10% vom Ausgangswert hatten in der histologischen Untersuchung statistisch signifikant größere Infarkte.

In unseren Untersuchungen war der arterielle Mitteldruck in der Reperfusionsphase sowohl in der Kontroll- als auch der Ischämiegruppe statistisch nicht unterschiedlich, sodass eine Blutdruckerniedrigung als Ursache der Hypoperfusion nicht in Frage kommt. Auch die unveränderten arteriellen und venösen Gefäßdurchmesser lassen eine Beteiligung dieser Parameter in der Reperfusionsphase an der Hypoperfusion als unwahrscheinlich erscheinen. Hier bleibt aber zu bedenken, dass mittels der Intravitalmikroskopie nur die oberflächlichen Gehirnabschnitte untersucht werden konnten, und somit keine Aussagen über im tieferen Hirngewebe oder an der Schädelbasis befindliche Gefäße getroffen werden konnten.

Allerdings konnten wir deutliche Veränderungen in der Kapillardichte feststellen.

In der Ischämiegruppe war die Kapillardichte in der Ischämiephase und in der gesamten Reperfusionsphase gegenüber der Kontrollphase signifikant vermindert. Außerdem war sie ab dem 1. Zeitpunkt der Ischämie (Zeitpunkt 5 Minuten) statistisch signifikant gegenüber allen folgenden Werten der Ischämie- und Reperfusionsphase gegenüber der Kontrollgruppe vermindert.

Durch die Aufteilung in die verschiedenen Ischämiegruppen konnten wir feststellen, dass die Tiere mit einer Durchblutungsabnahme < 10% vom Ausgangswert signifikant niedrigere Kapillardichten während der Ischämie- als auch während der gesamten Reperfusionsphase aufwiesen, als die Kontrollgruppe.

Unterteilt man die Versuchsgruppen in eine Gruppe mit Ischämie und mit Infarkt, eine Gruppe mit Ischämie aber ohne Infarkt und eine Kontrollgruppe, also ohne Ischämie und ohne Infarkt, zeigt sich folgendes Ergebnis: die Ischämiegruppe mit Infarkt zeigte von Beginn der Ischämie bis zum Ende der gesamten Reperfusionszeit eine signifikant verringerte Kapillardichte gegenüber der Ischämiegruppe ohne Infarktausbildung und der Kontrollgruppe. Somit kommt der Kapillardurchblutung eine wichtige Rolle bei der Entstehung oder Nichtentstehung eines Infarktes bei einer zerebralen Ischämie zuteil.

In einer Arbeit von Grogaard et al. [43] konnten keine durch Leukozyten verlegten Venolen oder Kapillaren gefunden werden während Hallenbeck et al. [46] sog. Plugger bei der fokalen zerebralen Ischämie postulierte.

In unserer Untersuchung fanden wir auf Ebene der Kapillaren keine, die Kapillare langsam durchrollenden Leukozyten, sogenannte Plugger. Kapillare komplett verschließende Leukozyten, sogenannte Sticker, wurden nur sehr selten gefunden. Die statistische Auswertung ergab folgerichtig für Plugger und Sticker keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die den Kapillaren nachgeschalteten perfundierten Venolen zeigten mehrere signifikante Unterschiede in der Ischämiegruppe zwischen der Ischämiephase und der Reperfusionsphase. Auch waren die Unterschiede zwischen der Ischämie- und Kontrollgruppe während der gesamten 2-stündigen Ischämiephase statistisch signifikant unterschiedlich.

Nach der Aufteilung in die oben genannten Ischämietiefen zeigten sich wiederum mehrere statistisch signifikante Unterschiede der beiden Gruppen mit starker Durchblutungsabnahme gegenüber der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% zum Ausgangswert und der Kontrollgruppe.

Die Unterteilung der eigentlichen Versuchsgruppen wie beim Parameter Kapillardichte, also Ischämiegruppe mit Infarkt, Ischämiegruppe ohne Infarkt und Kontrollgruppe zeigte ebenso statistisch signifikante Unterschiede. So war die Anzahl perfundierter Venolen in der Ischämiegruppe mit Infarkt in der gesamten Ischämiephase und bis 60 Minuten in der Reperfusionsphase deutlich signifikant verringert gegenüber der Ischämiegruppe ohne Infarkt und der Kontrollgruppe.

Somit führt eine starke Störung der zerebralen Mikrozirkulation zu einer deutlichen Infarzierung. Diese Infarzierung ist aber abhängig von der Ischämietiefe. Dies bedeutet umgekehrt, dass nicht jede Ischämie, auch wenn sie 2 Stunden anhält, einen histologisch messbaren Schaden am Hirnparenchym hinterlässt. Die genaue Ursache für diese Störungen

eventuell durch Kapillare verschließende Leukozyten, also Plugger oder Sticker, lässt sich aus unseren Ergebnissen aber nicht sicher herleiten. Auch eine Veränderung in der Vasomotorik der arteriellen oder venösen Gefäße scheidet u.E. aus. Ursächlich sehen wir Störungen auf Ebene der Kapillaren und die Kapillaren versorgenden kleinen Gefäße, den die Kapillaren nachgeschalteten Venolen. Hier kam es zu signifikanten Korrelationen zwischen Abnahme der Kapillardicht und Abnahme der perfundierenden Venolen und der Infarktausbildung.

4.2.3. Neuroscore und Infarktgröße

In vielen Untersuchungen der zerebralen Ischämie ist das neurologische Defizit ein wichtiger Parameter. Auch in unseren Versuchen haben wir täglich eine neurologische Untersuchung durchgeführt. Dabei konnten wir feststellen, dass es nach einer fokalen zerebralen Ischämie zu einem signifikanten Defizit kommt. Auch nach Aufteilung der Ischämietiere in Gruppen mit den 3 oben genannten Durchblutungsabnahmen blieb diese statistische Signifikanz erhalten. Unter Beibehaltung dieser Unterteilung war zudem zu erkennen, dass sich in beiden Gruppen mit einer starken Durchblutungsabnahme ein statistisch signifikant größerer Infarkt ausbildete als in der Gruppe mit geringer Durchblutungsabnahme, d.h. > 30% vom Ausgangswert, und der Kontrollgruppe.

4.2.4. Leukozyten und sekundärer Hirnschaden

Die intravitalmikroskopischen Beobachtungen konnten zeigen, dass es nach einer fokalen zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen kommt. Dabei ergab die quantitative Auswertung einen signifikanten Anstieg von an der Gefäßwand entlangrollenden Leukozyten, sogenannter Roller, in den postkapillären Venolen der Ischämietiere. Bereits zum ersten Messwert nach Ende der Ischämie zeigte sich ein messbarer und statistisch signifikant erhöhter Wert. Der danach folgende Anstieg der Roller war zu jedem weiteren Messzeitpunkt ebenfalls statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise konnte nach Aufteilung in die verschiedenen Ischämiegruppen festgestellt werden, dass diese Signifikanz nur in der Gruppe mit einer geringen Durchblutungsabnahme, nämlich einer Abnahme der Durchblutung von > 30% vom Ausgangswert, bestand und nicht in Gruppen mit einer starken Durchblutungsabnahme während der Ischämiephase, was zu erwarten gewesen wäre. Einige Autoren behaupten, dass Leukozyten zu einer Initiierung und Entwicklung eines Infarktes nach einem ischämischen Ereignis beitragen [114] [39]. Nach

unseren Ergebnissen können wir dies so nicht bestätigen, denn in der Gruppe mit einer Durchblutungsabnahme > 30% vom Ausgangswert und statistisch signifikantem Leukozytenanstieg in der Reperfusionsphase war kein Infarkt histologisch messbar. Denkbar wäre somit eine protektive Wirkung der aktivierten Leukozyten bei geringer Durchblutungsabnahme während der Ischämie.

Dagegen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede von am venösen Gefäßendothel fest anheftenden Leukozyten, sogenannter Sticker, sowie Rollern und Stickern in arteriellen Gefäßen festgestellt werden. Auch nach Aufteilung in die verschiedenen Ischämietiefen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Diese Beobachtung findet sich auch bei anderen Autoren.

In unseren weiteren Versuchen, bei denen die Beobachtungen der Leukozyten-Endothel-Interaktionen der Reperfusionszeit auf spätere Zeitpunkte, nämlich 12h, 24h, 48h, 72h und 96h nach Ende der Ischämiephase, untersucht wurden, zeigten sich in diesen o.g. Gruppen statistisch signifikant erhöhte Anzahlen sowohl an Rollern, als auch Stickern in venösen Gefäßen gegenüber der Kontrollgruppe.

Anhand dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der fokalen zerebralen Ischämie in der frühen Reperfusionsphase beginnen und danach noch über Tage, bis zu 96h nach dem eigentlichen Ende der fokalen zerebralen Ischämie, anhalten. Bereits Barone et al. beschrieben den zeitlichen Verlauf, wonach 2-12 Stunden nach Beginn der Ischämie typische Entzündungsmediatoren, wie z.B. Il-1 und TNF α die Entzündungsreaktion weiterführen [5]. Inwieweit aber bei unserer letztgenannten Versuchsreihe wieder verstärkte Leukozyten-Endothelinteraktionen nur bei einer geringen Durchblutungsabnahme oder unabhängig von der Durchblutungsabnahme während der Ischämie stattfand, konnten wir, aufgrund des Versuchsprotokolls, nicht klären.

Die Anzahl der Roller in den untersuchten venösen Gefäßen, die zum Ende der Reperfusionsphase signifikant ansteigt, führt nach unseren Ergebnissen nicht zu einer Veränderung der lokalen Gehirndurchblutung, da diese, gemessen durch die Laser-Doppler-Fluxmetrie, sich nicht ändert.

Einen Einfluss der rollenden Leukozyten in den venösen Gefäßen auf die Vasomotorik dieser Gefäße konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, da sich die Gefäßdurchmesser der untersuchten venösen Gefäßabschnitte während der gesamten Reperfusionsphase nicht änderten.

Ein vermehrtes Rollen oder gar festes Anheften von Leukozyten durch die chirurgische Präparation oder durch die Narkose halten wir für unwahrscheinlich. Zum einen ist die

92

Unterbindung der A. carotis am Hals des Versuchstieres schonender als andere Methoden zur Herbeiführung einer fokalen zerebralen Ischämie, wie z.B. dem Gefäßklipping nach Eröffnen des Schädels oder Hypotension durch Hämorrhagie. Außerdem bleibt bei unserer chirurgischen Präparation die Dura mater intakt. Da sich in der Auswertung der Leukozyten-Endothelinteraktionen keine Aktivierung in der Kontrollphase in beiden Tiergruppen zeigt, gehen wir von einer schonenden, die Leukozyten nicht-aktivierenden, Präparation aus.

Ritter et al. konnten durch intravitalmikroskopische Untersuchungen der zerebralen Mikrozirkulation an Ratten auch eine Aktivierung von Leukozyten nach 2-stündiger Ischämie erkennen [90]. Dabei waren die Leukozyten-Endothelinteraktionen, d.h. sowohl das Rollen als auch das Sticken von Leukozyten, vor allem in Venolen signifikant erhöht. In Arteriolen hingegen sahen sie zwar einen Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe, aber ohne Signifikanz. Als Versuchsmodell wurde ein intraluminales Fadenmodel nach Longa et al. verwendet. Ein Kriterium der Ischämietiefe gab es nicht. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Versuchstiere unterschiedliche Ischämietiefen hatten. Außerdem kam es auch in der Kontrollgruppe zu einem Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen, wobei die Anzahl von Stickern deutlich höher war, als die Anzahl an Rollern in den untersuchten Venolen. Da die Präparation und Implantation des intraluminalen Fadens in die A. carotis interna vor der Visualisierung der Mikrozirkulation durch die Intravitalmikroskopie stattfand, ist außerdem eine unbeobachtete und vor der Induktion der eigentlichen Ischämie stattfindende Leukozytenaktivierung möglich.

Hierfür würde auch sprechen, dass die für ein Auftreten von Rollern und Stickern bei Ratten an einem MCAO-Modell nach Zhang et al. notwendige Expression von endothelialem ICAM signifikant erst nach 2 Stunden Reperfusion bzw. 4 Stunden nach Ischämie auftrat [116].

Wie Barone et al. bereits 1995 in ihren Versuchen an hypertensiven Ratten zeigen konnten, kam es bis zu 5 Tage nach Ende der transienten fokalen Ischämie zu einem signifikanten Anstieg der Myeloperoxidase und Leukotrien B4 als Zeichen einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten im fokal ischämischen Hirngewebe ([6]. Sie konnten zudem anhand histochemischer Analysen eine Myeloperoxidase-Aktivität in Makrophagen im zerebralen Infarkt nachweisen. Auch Wang et al. fanden an einem gleichen Modell sowohl bereits 3 Stunden, als auch noch am 5. Tag nach Ende der fokalen zerebralen Ischämie, eine signifikant erhöhte Expression von ICAM-1 mRNA [108].

Diese zeitlichen Abläufe konnten wir auch in unseren Ergebnissen wiederfinden.

Die Ergebnisse, wonach eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins Hirnparenchym stattfinden soll, wird durch eine aktuellere Untersuchung von Enzmann et al. widerlegt [35].

Demnach befanden sich die aufgefunden neutrophilen Granulozyten nur im Gefäßlumen, aber nicht im Hirngewebe selbst. Dagegen beschriebt Hermann et al in seiner Arbeit aus dem Jahr 2018, eine Akkumulation von Leukozyten im Hirnparenchym nach fokaler zerebraler Ischämie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktion vom Versuchsprotokoll, von der verwendeten Tierart, der chirurgischen Präparation, Dauer der Ischämie und Zeitraum der Beobachtung der Reperfusion abhängt.

In unseren Versuchen mit dem passenden Versuchstier, einer schonenden, die Leukozyten-Endothelinteraktion nicht aktivierenden chirurgischen Präparation und ausreichend langen Beobachtungsphasen konnte zuverlässig eine Leukozytenaktivierung als Folge einer transienten fokalen zerebralen Ischämie gefunden werden.

Interessant dabei ist die Tatsache, dass diese Aktivierung bei Tieren auftrat, die während der Ischämie nur eine geringe Abnahme der zerebralen Durchblutung zeigten.

Folgende Interpretationen sind nach den Ergebnissen festzuhalten:

1. Durch die transiente fokale zerebrale Ischämie wird ein histologisch nachweisbarer Hirnschaden produziert. Dieser Schaden trat in Ischämiegruppen mit tiefer Ischämie signifikant häufiger auf. Allerdings kam es in diesen Gruppen nicht zu einem signifikanten Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen, sondern das Gegenteil war der Fall. Es zeigte sich in der Ischämiegruppe mit milderer Ischämie und mit histologisch geringerer Infarktausbildung eine vermehrte Leukozyten-Endothelinteraktion.

2. Es gibt eine Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen die noch mehrere Tage, in unseren Untersuchungen bis zu 4 Tage, nach dem Akutereignis auftreten und nachweisbar sind. Hier muss geklärt werden, welche Auswirkungen diese Leukozyten-Endothelinteraktionen haben.

3. Die Abnahme der Durchblutung in der Mikrozirkulation war in Gruppen mit tiefer Ischämie signifikant und in diesen Gruppen traten signifikant größere Infarktvolumina auf, allerdings

ohne ein vermehrtes Auftreten von Leukozyten. Es muss daher geklärt werden, welche Mechanismen zur Abnahme der Mikrozirkulation führen, da eine Leukozyten-Endothelinteraktion unserer Meinung nach nicht dafür verantwortlich ist.

Nach unseren Ergebnissen und Ergebnissen aus anderen Untersuchungen bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie ist zu folgern, dass Leukozyten-Endothelinteraktionen nicht zwingend an der Entstehung eines Hirnschadens beteiligt sind. Da Leukozyten-Endothelinteraktionen aber nachweisbar sind, muss geklärt werden, welche Auswirkungen, eventuell auch protektive, sie auf die Entstehung und den Verlauf des Hirnschadens nehmen. Wenn sie positiven Einfluss haben, sollte geklärt werden, wann und wo Leukozyten vermehrt auftreten, und welche genauen Faktoren zu ihrem vermehrten Auftreten führen.

5. Zusammenfassung und Aussicht

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Leukozyten-Endothelinteraktion bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie. Wir konnten die Mikrozirkulation einerseits akut, d.h. vorwährend und bis zu 3 Stunden nach Ende der Ischämie kontinuierlich, andererseits in einem chronischen Modell auch nach 12, 24, 48 und 96 Stunden beobachten. Aus vielen unterschiedlichen Fachbereichen der Medizin weiß man, dass Leukozyten ein pathophysiologisches Potential haben. So konnte der negative Einfluss dieser Zellen z.B. bei Myokardischämien oder chronisch entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden. In der Literatur findet man aber auch Beispiele für positive Einflüsse von Leukozyten nach dem Ereignis einer Ischämie.

Mit dieser Arbeit wollten wir den Einfluss der weißen Blutkörperchen bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie auf die zerebrale Mikrozirkulation, und die daraus folgenden Veränderungen des Hirnparenchyms und auf die Neurologie untersuchen.

Hierfür konnten wir ein Modell etablieren, dass es ermöglichte, verschiedene Parameter der Mikrozirkulation, vor allem die Leukozyten-Endothelinteraktionen, in vivo zu untersuchen und einen Zusammenhang zu neurologischen Ausfällen und histomorphologischen Schäden zu erstellen. Durch unser Modell mit einem geschlossenen Schädelfenster und einer reversiblen Ischämie konnte ein Überleben der Versuchstiere über mehrere Tage erreicht werden und so die Veränderungen der Mikrozirkulation in der Akutphase den Langzeitauswirkungen gegenüberstellen.

Durch die 2-stündige Unterbindung der rechten A. carotis konnte eine transiente fokale zerebrale Ischämie induziert werden, die durch die Laser-Doppler-Fluxmetrie bestätigt wurde.

Nach Beendigung der transienten fokalen zerebralen Ischämie im Akutversuch kam es zu einem Anstieg rollender Leukozyten in postkapillären Venolen vor allem in Versuchstieren mit milderer Ischämie. Bei der Untersuchung der Leukozyten-Endothelinteraktionen 12 – 96 Stunden nach Ende der 2-stündigen Ischämie in einem weiteren Versuchsmodell zeigten sich weiterhin vermehrte Leukozyten-Endothelinteraktionen, diesmal durch gehäuftes Auftreten von Rollern und Stickern.

Während es in der Akutversuchsphase zu einer Abnahme der funktionellen Kapillardichte und der Anzahl perfundierter Venolen kam, waren bei den späten Untersuchungen diese beiden Parameter auf Normalniveau.

In den jeweiligen Kontrollgruppen kam es zu keiner Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktionen.

Die transiente fokale zerebrale Ischämie führt zu einem neurologischen Defizit bei den betroffenen Tieren. Die histologischen Untersuchungen zeigten bei diesen Tieren eine deutliche Infarzierung. Dabei waren Tiere mit einer milden Ischämie sowohl neurologisch als auch bei der Infarktausbildung deutlich geringer betroffen gegenüber Tieren mit tieferen Ischämien. Eine Korrelation zwischen neurologischem Schaden, Infarktausbildung und Auftreten von Leukozyten-Endothelinteraktionen konnten wir nicht finden. Er stellte sich dagegen heraus, dass es in der Akutphase zu vermehrten Leukozyten-Endothelinteraktionen bei Tieren kam, die eine milde Ischämie erlitten.

Wir konnten somit zeigen, dass es bei der transienten fokalen zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen kommt, die aber nicht mit der Tiefe der Ischämie korrelierten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Leukozytenaktivierung kein kurzzeitiges, sondern im Gegenteil, ein über mehrere Tage anhaltender, vielleicht sogar langsam zunehmender Prozess ist.

Zusammengefasst können wir feststellen, dass es in diesem Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung von Leukozyten-Endothelinteraktionen kommt-

Literaturverzeichnis

- 1. AMES A., WRIGHT R.L., KOWADA M., THURSTON J.M. & MAJNO G. 1968. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52(2): 437-53.
- 2. ANDJELKOVIC A.V., KERKOVICH D. & PACHTER J.S. 2000. Monocyte:astrocyte interactions regulate MCP-1 expression in both cell types. *J Leukoc Biol* 68(4): 545-52.
- 3. BAATZ H., STEINBAUER M., HARRIS A.G. & KROMBACH F. 1995. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15(2): 85-91.
- 4. BANATI R.B., GEHRMANN J., SCHUBERT P. & KREUTZBERG G.W. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7(1): 111-8.
- 5. BARONE F.C. & FEUERSTEIN G.Z. 1999. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 19(8): 819-34.
- 6. BARONE F.C., HILLEGASS L.M., TZIMAS M.N., SCHMIDT D.B., FOLEY J.J., WHITE R.F. et al. 1995. Time-related changes in myeloperoxidase activity and leukotriene B4 receptor binding reflect leukocyte influx in cerebral focal stroke. *Mol Chem Neuropathol* 24(1): 13-30.
- BARONE F.C., SCHMIDT D.B., HILLEGASS L.M., PRICE W.J., WHITE R.F., FEUERSTEIN G.Z. et al. 1992. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* 23(9): 1337-47; discussion 1347-8.
- 8. BECK J., STUMMER W., LEHMBERG J., BAETHMANN A. & UHL E. 1997. Leukocyteendothelium interactions in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 70: 53-5.
- 9. BECK J., STUMMER W., LEHMBERG J., BAETHMANN A. & UHL E. 2007. Arteriovenous transit time as a measure for microvascular perfusion in cerebral ischemia and reperfusion. *Neurosurgery* 61(4): 826-33; discussion 833-4.
- BEDNAR M.M., RAYMOND S., MCAULIFFE T., LODGE P.A. & GROSS C.E. 1991. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke* 22(1): 44-50.
- 11. BERAY-BERTHAT V., CROCI N., PLOTKINE M. & MARGAILL I. 2003. Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res* 987(1): 32-8.
- BERLIT P., POPESCU O., KLÖTZSCH C., DIEHL R.R. & BERG-DAMMER E. 1997. [Treatment of acute stroke on the stroke unit. Initial experiences with an acute stroke unit in Germany]. *Nervenarzt* 68(2): 122-8.
- 13. BORGOS J. 1996. Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow. *Neurol Res* 18(3): 251-5.
- 14. BOWES M.P., ZIVIN J.A. & ROTHLEIN R. 1993. Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Exp Neurol* 119(2): 215-9.
- 15. BROWN A.W. & BRIERLEY J.B. 1968. The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. *British journal of experimental pathology* 49(2): 87.
- 16. CANDELARIO-JALIL E. 2009. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 10(7): 644-54.
- 17. CAPDEVILLE C., PRUNEAU D., ALLIX M., PLOTKINE M. & BOULU R.G. 1986. Naloxone effect on the neurological deficit induced by forebrain ischemia in rats. *Life Sci* 38(5): 437-42.
- 18. CARDEN D.L. & GRANGER D.N. 2000. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(3): 255-66.

- 19. CARVALHO-TAVARES J., HICKEY M.J., HUTCHISON J., MICHAUD J., SUTCLIFFE I.T. & KUBES P. 2000. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factoralpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res* 87(12): 1141-8.
- 20. CHEN L.Y., NICHOLS W.W., HENDRICKS J.B., YANG B.C. & MEHTA J.L. 1994. Monoclonal antibody to P-selectin (PB1.3) protects against myocardial reperfusion injury in the dog. *Cardiovasc Res* 28(9): 1414-22.
- 21. CHEN P.H., GAO S., WANG Y.J., XU A.D., LI Y.S. & WANG D. 2012. Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther* 18(6): 452-6.
- 22. CHIANG J., KOWADA M., AMES A., WRIGHT R.L. & MAJNO G. 1968. Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Am J Pathol* 52(2): 455-76.
- 23. CLARK R.K., LEE E.V., WHITE R.F., JONAK Z.L., FEUERSTEIN G.Z. & BARONE F.C. 1994. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res Bull* 35(4): 387-92.
- 24. CONNOLLY E.S., WINFREE C.J., SPRINGER T.A., NAKA Y., LIAO H., YAN S.D. et al. 1996. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97(1): 209-16.
- 25. CRAIN B.J., WESTERKAM W.D., HARRISON A.H. & NADLER J.V. 1988. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 27(2): 387-402.
- 26. DANTON G.H. & DIETRICH W.D. 2003. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(2): 127-36.
- 27. DEL ZOPPO G.J. 1994. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 6(1): 47-96.
- 28. DEL ZOPPO G.J., SCHMID-SCHÖNBEIN G.W., MORI E., COPELAND B.R. & CHANG C.M. 1991. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22(10): 1276-83.
- 29. DIRNAGL U., IADECOLA C. & MOSKOWITZ M.A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22(9): 391-7.
- DIRNAGL U., KAPLAN B., JACEWICZ M. & PULSINELLI W. 1989. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9(5): 589-96.
- 31. DIRNAGL U. & PULSINELLI W. 1990. Autoregulation of cerebral blood flow in experimental focal brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10(3): 327-36.
- 32. DREIER J.P. 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17(4): 439-47.
- 33. DUSZCZYK M., ZIEMBOWICZ A., GADAMSKI R., WIERONSKA J.M., SMIALOWSKA M. & LAZAREWICZ J.W. 2009. Changes in the NPY immunoreactivity in gerbil hippocampus after hypoxic and ischemic preconditioning. *Neuropeptides* 43(1): 31-9.
- 34. EASTON J.D., SAVER J.L., ALBERS G.W., ALBERTS M.J., CHATURVEDI S., FELDMANN E. et al. 2009. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke* 40(6): 2276-93.
- 35. ENZMANN G., MYSIOREK C., GORINA R., CHENG Y.J., GHAVAMPOUR S., HANNOCKS M.J. et al. 2013. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear

granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 125(3): 395-412.

- 36. GAO S., WANG Y.J., XU A.D., LI Y.S. & WANG D.Z. 2011. Chinese ischemic stroke subclassification. *Front Neurol* 2: 6.
- 37. GARCIA J.H., LIU K.F., YOSHIDA Y., CHEN S. & LIAN J. 1994. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol* 145(3): 728-40.
- GARCIA J.H., LIU K.F., YOSHIDA Y., LIAN J., CHEN S. & DEL ZOPPO G.J. 1994. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 144(1): 188-99.
- 39. GAVINS F., YILMAZ G. & GRANGER D.N. 2009. The evolving paradigm for blood cellendothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation*
- 40. GINSBERG M.D. 1997. Animal Models of Global and Focal Cerebral Ischemia. Primer on Cerebrovascular Diseases: 124-126.
- 41. GINSBERG M.D. & BUSTO R. 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20(12): 1627-42.
- 42. GLICKMAN S.E., HIGGINS T.J. & ISAACSON R.L. 1970. Some effects of hippocampal lesions on the behavior of Mongolian gerbils. *Physiology & behavior* 5(8): 931-938.
- 43. GRÃ ?, GAARD B., SCHÃ ?¹/₄RER L., GERDIN B. & ARFORS K.E. 1989. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 9(4): 500-505.
- 44. HABERL R.L., HEIZER M.L., MARMAROU A. & ELLIS E.F. 1989. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. *Am J Physiol* 256(4 Pt 2): H1247-54.
- 45. HALLENBECK J.M. & DUTKA A.J. 1990. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol* 47(11): 1245-54.
- 46. HALLENBECK J.M., DUTKA A.J., TANISHIMA T., KOCHANEK P.M., KUMAROO K.K., THOMPSON C.B. et al. 1986. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17(2): 246-53.
- 47. HAMBLIN A., TAYLOR M., BERNHAGEN J., SHAKOOR Z., MAYALL S., NOBLE G. et al. 1992. A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Methods* 146(2): 219-28.
- 48. HANISCH U.K. & KETTENMANN H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11): 1387-94.
- 49. HÄRTL R., SCHÜRER L., SCHMID-SCHÖNBEIN G.W. & DEL ZOPPO G.J. 1996. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(6): 1108-19.
- 50. HERMANN D.M., KLEINSCHNITZ C. & GUNZER M. 2018. Implications of polymorphonuclear neutrophils for ischemic stroke and intracerebral hemorrhage: Predictive value, pathophysiological consequences and utility as therapeutic target. *J Neuroimmunol* 321: 138-143.
- 51. IADECOLA C. & ANRATHER J. 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17(7): 796-808.
- 52. ISHIKAWA M., COOPER D., RUSSELL J., SALTER J.W., ZHANG J.H., NANDA A. et al. 2003. Molecular determinants of the prothrombogenic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke* 34(7): 1777-82.
- 53. ISHIKAWA M., VOWINKEL T., STOKES K.Y., ARUMUGAM T.V., YILMAZ G., NANDA A. et al. 2005. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* 111(13): 1690-6.

- 54. JIN A.Y., TUOR U.I., RUSHFORTH D., KAUR J., MULLER R.N., PETTERSON J.L. et al. 2010. Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. *BMC Neurosci* 11: 12.
- 55. JIN R., YANG G. & LI G. 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87(5): 779-89.
- 56. JONES T.H., MORAWETZ R.B., CROWELL R.M., MARCOUX F.W., FITZGIBBON S.J., DEGIROLAMI U. et al. 1981. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 54(6): 773-82.
- 57. KATO H., ARAKI T. & KOGURE K. 1992. Preserved neurotransmitter receptor binding following ischemia in preconditioned gerbil brain. *Brain Res Bull* 29(3-4): 395-400.
- 58. KAWAMURA S., SCHÜRER L., GOETZ A., KEMPSKI O., SCHMUCKER B. & BAETHMANN A. 1990. An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 9(4): 369-83.
- 59. KEMPSKI O.S. 1994. [Neuroprotection. Models and basic principles]. *Der Anaesthesist* 43: S25-33.
- 60. KIRKPATRICK U.J., ADAMS R.A., LARDI A. & MCCOLLUM C.N. 1998. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br J Haematol* 101(2): 364-8.
- 61. KOCHANEK P.M. & HALLENBECK J.M. 1992. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 23(9): 1367-79.
- 62. KUZHANDAIVEL A., NISTRI A. & MLADINIC M. 2010. Kainate-mediated excitotoxicity induces neuronal death in the rat spinal cord in vitro via a PARP-1 dependent cell death pathway (Parthanatos). *Cell Mol Neurobiol* 30(7): 1001-12.
- 63. LEE J.G., HUDETZ A.G., SMITH J.J., HILLARD C.J., BOSNJAK Z.J. & KAMPINE J.P. 1994. The effects of halothane and isoflurane on cerebrocortical microcirculation and autoregulation as assessed by laser-Doppler flowmetry. *Anesth Analg* 79(1): 58-65.
- 64. LEHMBERG J., BECK J., BAETHMANN A. & UHL E. 2006. Effect of P-selectin inhibition on leukocyte-endothelium interaction and survival after global cerebral ischemia. *J Neurol* 253(3): 357-63.
- 65. LEVINE S. & PAYAN H. 1966. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (Meriones unguiculatus). *Exp Neurol* 16(3): 255-62.
- 66. LEVY D.E. & BRIERLEY J.B. 1974. Communications between vertebro-basilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp Neurol* 45(3): 503-8.
- 67. LIPTON P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79(4): 1431-568.
- 68. LIU L. & KUBES P. 2003. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organspecific mechanisms of action. *Thromb Haemost* 89(2): 213-20.
- 69. LLOYD-JONES D., ADAMS R., CARNETHON M., DE SIMONE G., FERGUSON T.B., FLEGAL K. et al. 2009. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119(3): 480-6.
- 70. LO E.H., DALKARA T. & MOSKOWITZ M.A. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4(5): 399-415.
- 71. MACREZ R., ALI C., TOUTIRAIS O., LE MAUFF B., DEFER G., DIRNAGL U. et al. 2011. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 10(5): 471-80.
- 72. MATTLE H.P., KAPPELER L., ARNOLD M., FISCHER U., NEDELTCHEV K., REMONDA L. et al. 2005. Blood pressure and vessel recanalization in the first hours after ischemic stroke. *Stroke* 36(2): 264-268.

- 73. MEYER J.S. 1958. Localized changes in properties of the blood and effects of anticoagulant drugs in experimental cerebral infarction. *N Engl J Med* 258(4): 151-9.
- 74. MICHELUCCI A., HEURTAUX T., GRANDBARBE L., MORGA E. & HEUSCHLING P. 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and antiinflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. J Neuroimmunol 210(1-2): 3-12.
- 75. MIES G., PASCHEN W. & HOSSMANN K.-A. 1990. Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 10(5): 638-645.
- 76. MOLINARI GF L.J.P. 1976. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 7: 14-17.
- 77. MORI E., DEL ZOPPO G.J., CHAMBERS J.D., COPELAND B.R. & ARFORS K.E. 1992. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke* 23(5): 712-8.
- NAKAMURA H., STRONG A.J., DOHMEN C., SAKOWITZ O.W., VOLLMAR S., SUÉ M. et al. 2010. Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain* 133(Pt 7): 1994-2006.
- 79. NASH G.B., JONES J.G., MIKITA J., CHRISTOPHER B. & DORMANDY J.A. 1988. Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 70(2): 171-6.
- NEMOTO E.D.W.I.N.M., HOSSMANN K.O.N.S.T.A.N.T.I.N.-A.L.E.X.A.N.D.E.R. & COOPER H.E.L.E.N.K. 1981. Post-ischemic hypermetabolism in cat brain. *Stroke* 12(5): 666-676.
- 81. OBRENOVITCH T.P. 1995. The ischaemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7(4): 297-323.
- 82. PALLAST S., ARAI K., WANG X., LO E.H. & VAN LEYEN K. 2009. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem* 111(3): 882-9.
- 83. PALLAST S., ARAI K., WANG X., LO E.H. & VAN LEYEN K. 2009. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem* 111(3): 882-9.
- PETERS O., BACK T., LINDAUER U., BUSCH C., MEGOW D., DREIER J. et al. 1998. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(2): 196-205.
- 85. PRESTIGIACOMO C.J., KIM S.C., CONNOLLY E.S., LIAO H., YAN S.F. & PINSKY D.J. 1999. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* 30(5): 1110-7.
- 86. QIN A.P., ZHANG H.L. & QIN Z.H. 2008. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull* 24(2): 117-23.
- 87. QIN A.P., ZHANG H.L. & QIN Z.H. 2008. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull* 24(2): 117-23.
- 88. RANSOHOFF R.M. & PERRY V.H. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-45.
- 89. REED M.W. & MILLER F.N. 1988. Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36(1): 104-7.
- RITTER L.S., OROZCO J.A., COULL B.M., MCDONAGH P.F. & ROSENBLUM W.I. 2000. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31(5): 1153-61.
- 91. SACCO R.L., KASNER S.E., BRODERICK J.P., CAPLAN L.R., CONNORS J.J., CULEBRAS A. et al. 2013. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44(7): 2064-89.

- 92. SATOH S.-I., TOSHIMA Y., IKEGAKI I., IWASAKI M. & ASANO T. 2007. Wide therapeutic time window for fasudil neuroprotection against ischemia-induced delayed neuronal death in gerbils. *Brain research* 1128: 175-180.
- 93. SHAH S.M. & HUFF J.S. 2002. Stroke. Introduction. *Emerg Med Clin North Am* 20(3): xiii-xvi.
- 94. SHIN H.K., DUNN A.K., JONES P.B., BOAS D.A., MOSKOWITZ M.A. & AYATA C. 2006. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(8): 1018-30.
- 95. SIESJÖ B.K., KATSURA K., ZHAO Q., FOLBERGROVÁ J., PAHLMARK K., SIESJÖ P. et al. 1995. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma* 12(5): 943-56.
- SORIANO S.G., COXON A., WANG Y.F., FROSCH M.P., LIPTON S.A., HICKEY P.R. et al. 1999. Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* 30(1): 134-9.
- 97. SPRINGER T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2): 301-14.
- 98. STEINBAUER M., HARRIS A.G., LEIDERER R., ABELS C. & MESSMER K. 1998. Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 9(5): 345-51.
- 99. STEVENS M.K., YAKSH T.L., HANSEN R.B. & ANDERSON R.E. 1986. Effect of preischemia cyclooxygenase inhibition by zomepirac sodium on reflow, cerebral autoregulation, and EEG recovery in the cat after global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 6: 691-702.
- 100. STREIT W.J. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40(2): 133-9.
- SUZUKI H., HAYASHI T., TOJO S.J., KITAGAWA H., KIMURA K., MIZUGAKI M. et al. 1999. Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury. *Neurosci Lett* 265(3): 163-6.
- 102. TAMURA A.K.I.R.A. & H.I.T.O.S.H.I. NAKAYAMA 1997. Neuronal damage in remote areas after focal cerebral infarct: retrograde degeneration and trans-synaptic death. Academic Press, San Diego. 1997.
- 103. TRAYSTMAN R.J. 2003. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 44(2): 85-95.
- 104. TSUCHIDATE R., HE Q.P., SMITH M.L. & SIESJÖ B.K. 1997. Regional cerebral blood flow during and after 2 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17(10): 1066-73.
- 105. TUPPER D.E. & WALLACE R.B. 1980. Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 40(6): 999-1003.
- 106. UNTERBERG A., WAHL M. & BAETHMANN A. 1988. Studies of pial vascular permeability. *Stroke* 19(10): 1306-7.
- 107. VILLRINGER A., DIRNAGL U., THEM A., SCHÜRER L., KROMBACH F. & EINHÄUPL K.M. 1991. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* 42(3): 305-15.
- 108. WANG X., SIREN A.L., LIU Y., YUE T.L., BARONE F.C. & FEUERSTEIN G.Z. 1994. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 26(1-2): 61-8.
- 109. WEBER K., BAETHMANN A. & KEMPSKI O. 1988. Determinants of survival after forebrain ischemia in Mongolian gerbils. *Metab Brain Dis* 3(4): 247-55.
- 110. WILLIAMS P.C., STERN M.D., BOWEN P.D., BROOKS R.A., HAMMOCK M.K., BOWMAN R.L. et al. 1980. Mapping of cerebral cortical strokes in Rhesus monkeys by laser Doppler spectroscopy. *Med Res Eng* 13(2): 3-5.

- 111. XING C., ARAI K., LO E.H. & HOMMEL M. 2012. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 7(5): 378-85.
- 112. XING C., ARAI K., LO E.H. & HOMMEL M. 2012. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 7(5): 378-85.
- 113. YAMAKAWA T., YAMAGUCHI S., NIIMI H. & SUGIYAMA I. 1987. White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study. *Circ Shock* 22(4): 323-32.
- 114. YILMAZ G. & GRANGER D.N. 2008. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 30(8): 783-93.
- 115. ZEINTL H., SACK F.U., INTAGLIETTA M. & MESSMER K. 1989. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 8(3): 293-302.
- 116. ZHANG R.L., CHOPP M., CHEN H. & GARCIA J.H. 1994. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125(1): 3-10.

Danksagung

Die Tierversuche und die dazugehörigen Auswertungen wurden am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig – Maximilians – Universität, München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. A. Baethmann durchgeführt.

Herrn Professor Meßmer, dem damaligen Direktor des Instituts für chirurgische Forschung, möchte ich für die Aufnahme in seinem Institut danken.

Herrn Professor Baethmann möchte ich für die Aufnahme in seine experimentelle neurochirurgische Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, wissenschaftlich zu arbeiten danken und Herrn Professor Uhl für die Überlassung der Doktorarbeit.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. J. Beck für die konstruktive Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung dieser Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich dem gesamten Team der experimentellen neurochirurgischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. A. Baethmann meinen Dank für die Unterstützung und Mithilfe bei den Versuchen und den experimentellen Auswertungen aussprechen. Hier gilt mein ganz besonders Dank Dr. rer. nat. J. Peters für die statistische Auswertung.

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN Promotionsbüro Medizinische Fakultät MMRS **Eidesstattliche Versicherung** ECUHOFF, JENS Name, Vorname Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel Leukozyten-Endothelinteraktionen bei der transieuten folkalen zerebralen Ischämie selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde. plieuchey 10157'22 brt, Datum ECKHOFF, JENS Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand Eidesstattliche Versicherung Oktober 2021