

Aus dem Walter Brendel Zentrums für Experimentelle Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

# Beeinflussung der zerebralen Mikrozirkulation durch Inhalation von Stickstoffmonoxid (NO)

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

vorgelegt von  
Seong Woong Kim  
aus Seoul, Südkorea

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Gerhard Kuhnle
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Roman L. Haberl Prof. Dr. Frank Christ
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Januar. 2009

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1	VERSUCHSTIERE .....	18
2.2	EXPERIMENTELLE MODELLE.....	18
2.2.1	<i>Narkose</i> .....	18
2.2.2	<i>Regelung der Körpertemperatur</i> .....	18
2.2.3	<i>Intubation und Ventilation</i> .....	19
2.2.4	<i>Mikrokapnometrie</i> .....	19
2.2.5	<i>Arterieller und venöser Zugang</i> .....	20
2.2.6	<i>Blutgasanalyse</i> .....	20
2.2.7	<i>Laser Doppler Fluxmetrie</i> .....	21
2.2.8	<i>Zerebrale Oligämie</i> .....	22
2.2.9	<i>Verschuß der A. cerebri media (MCA Okklusion)</i> .....	22
2.2.10	<i>Histologie</i> .....	23
2.2.11	<i>Transdurales Schädelfenster</i> .....	24
2.2.12	<i>Visualisierung pialer Gefäße</i> .....	25
2.2.13	<i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie zerebraler Gefäße</i> .....	25
2.2.14	<i>Stickstoffmonoxid (NO) Inhalation (NOi)</i> .....	26
2.2.15	<i>Hemmung der Guanylyl Cyclase</i> .....	26
2.2.16	<i>Messung von NO in situ</i> .....	26
2.3	VERSUCHSPROTOKOLLE .....	28
2.4	ANALYSE .....	29
2.4.1	<i>Quantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie</i> .....	29

2.5	EINSCHLUSSKRITERIEN.....	30
2.6	STATISTIK.....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
3.1	NO-INHALATION (NOI) UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.....	32
3.1.1	<i>Physiologische Parameter.....</i>	32
3.1.2	<i>Intravitalmikroskopische Beobachtungen .....</i>	33
3.2	NOI MIT ANSCHLIEßENDER CO <sub>2</sub> -INHALATION UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN .	36
3.2.1	<i>Physiologische Parameter.....</i>	36
3.2.2	<i>Arteriöläre und Venöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	36
3.3	NOI WÄHREND ODQ-SUPERFUSION UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.....	37
3.3.1	<i>Physiologische Parameter.....</i>	37
3.3.2	<i>Venöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	38
3.4	NOI UNTER OLIGÄMISCHEN BEDINGUNGEN.....	39
3.4.1	<i>Physiologische Parameter.....</i>	39
3.4.2	<i>Hirndurchblutung.....</i>	40
3.4.3	<i>Intravitalmikroskopische Beobachtungen .....</i>	42
3.4.4	<i>Arteriöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	42
3.4.5	<i>Venöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	43
3.5	NOI UNTER BEDINGUNGEN EINER FOKALEN ZEREBRALEN ISCHÄMIE.....	44
3.5.1	<i>Physiologische Parameter.....</i>	44
3.5.2	<i>Lokale Hirndurchblutung .....</i>	45
3.5.3	<i>Arteriöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	46
3.5.4	<i>Venöläre Gefäßdurchmesser .....</i>	47
3.6	NOI WÄHREND ODQ-SUPERFUSION UNTER BEDINGUNGEN EINER FOKALEN ZEREBRALEN ISCHÄMIE .....	48

3.6.1	<i>Physiologische Parameter</i> .....	48
3.6.2	<i>Durchmesser zerebraler Venolen</i> .....	49
3.6.3	<i>Arteriöläre Gefäßdurchmesser</i> .....	50
3.7	VERGLEICH DER EXPRESSION VON DAF MIT UND OHNE NOI UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN SOWIE MIT NOI UNTER OLIGÄMISCHEN BEDINGUNGEN. ....	52
3.7.1	<i>Physiologische Parameter</i> .....	52
3.7.2	<i>Arteriöläre Expression von DAF</i> .....	52
3.7.3	<i>Venöläre Expression von DAF</i> .....	53
3.7.4	<i>Die Quantifizierung der DAF-Fluoreszenz</i> .....	53
3.8	AUSWIRKUNGEN DER NOI AUF DAS INFARKTVOLUMEN NACH PERMANENTER FOKALER ISCHÄMIE .....	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>57</b>
4.1	DISKUSSION DER METHODE .....	57
4.1.1	<i>Das experimentelle Modell des Schlaganfalls</i> .....	57
4.1.2	<i>Wahl des Tierstamms</i> .....	57
4.1.3	<i>Anästhesie</i> .....	58
4.1.4	<i>Kontrollierte mechanische Beatmung</i> .....	59
4.1.5	<i>Kapnometrie</i> .....	61
4.1.6	<i>Laser Doppler Fluxmetrie</i> .....	62
4.1.7	<i>Intravitalmikroskopie</i> .....	63
4.1.8	<i>Untersuchung der Mikrozirkulation</i> .....	64
4.1.9	<i>ODQ</i> .....	65
4.1.10	<i>DAF</i> .....	65
4.1.11	<i>Histologie</i> .....	66

4.1.12	<i>Dosierung von NO</i> .....	67
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	68
4.2.1	<i>NO-Inhalation unter physiologischen Bedingungen</i> .....	68
4.2.2	<i>Inhaliertes NO und CO<sub>2</sub></i> .....	71
4.2.3	<i>Inhaliertes NO mit ODQ</i> .....	71
4.2.4	<i>Inhaliertes NO mit DAF-FM</i> .....	72
4.3	PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDINGUNGEN .....	73
4.3.1	<i>Inhaliertes NO unter Oligämie</i> .....	73
4.3.2	<i>Inhaliertes NO nach fokaler zerebraler Ischämie</i> .....	74
4.3.3	<i>Histologie</i> .....	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>99</b>

# 1 EINLEITUNG

Der Schlaganfall ist in Industrieländern nach ischämischen Herzerkrankungen und bösartigen Neubildungen die dritthäufigste Todesursache und die häufigste Ursache von permanenter Behinderung im Erwachsenenalter. In Deutschland tritt er mit einer Inzidenz von 250-400/100.000 auf, ein Wert, der auch auf andere industrialisierte Staaten Asiens und Europas zutrifft (British Heart Foundation 2002). Ein Drittel der Patienten, die einen Schlaganfall mehr als ein Jahr überlebt haben, sind bei Verrichtung von Alltagstätigkeiten dauerhaft auf fremde Hilfe angewiesen (Schneider et al. 1999, American Heart Association 2001).

Beim Schlaganfall unterscheidet man zwischen hämorrhagischen und ischämischen Infarkten. Zu den hämorrhagischen Infarkten, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, zählen die Subarachnoidalblutung und die intraparenchymatöse Blutung; diese machen jedoch nur einen kleinen Teil der Gesamterkrankungen aus (5%). Viel häufiger ist die zerebrale Ischämie.

Von einem ischämischen Schlaganfall spricht man, wenn transient oder permanent einer Reduktion der zerebralen Durchblutung eintritt. Schon nach kurzer Ischämiedauer kommt es zu einem Sistieren der Zellfunktionen; wird die Durchblutung nicht oder verspätet wiederhergestellt, kann auch der Strukturstoffwechsel der Zellen nicht aufrecht erhalten werden. Es kommt zum Zelltod.

Die Einteilung der Ischämie erfolgt einmal anhand des Ausmaßes der Durchblutungseinschränkung: Von globaler zerebraler Ischämie spricht man, wenn die Durchblutung im gesamten Gehirn bzw. im Großteil beider Hemisphären reduziert ist. Die regionale oder fokale zerebrale Ischämie, auf die sich diese Arbeit bezieht, ist hingegen auf das Versorgungsgebiet einer intrakraniellen Arterie beschränkt.

Ätiologisch liegt ihr ein arterieller Verschluss zugrunde. Dieser kann durch eine Embolie oder eine lokale Thrombose erfolgen (Taylor et al. 1996).

Nach dem Gefäßverschluss fällt in einem umschriebenen Bereich des Hirnparenchyms die Durchblutung so stark ab, dass die Neuronen dort sofort absterben. Diese Region wird als Kernbereich des Infarkts oder „Core“ – Region bezeichnet. Um den Core herum befindet sich eine Zone, in der die Durchblutung

signifikant reduziert ist. Die Zellen in diesem Gebiet zeigen zwar keine funktionelle Aktivität mehr, sie sind jedoch strukturell noch intakt, da für das Aufrechterhalten des Strukturstoffwechsels weniger Energie notwendig ist (Astrup et al. 1977). Diese Region nennt man die ischämische Penumbra (Astrup et al. 1981, Hakim. 1987). Solange die Zellen der Penumbra noch strukturell intakt sind, können sie bei Wiederherstellung der zerebralen Perfusion ihre Funktion wieder aufnehmen. Wird die Durchblutung jedoch nicht wiederhergestellt, sterben die Neuronen in der Penumbra ab, der Infarkt - Core vergrößert sich.

Baron schlug drei Kriterien vor, die die ischämische Penumbra im lebenden menschlichen Gehirn definieren (Baron. 1999): (1) Die Neuronen der Penumbra sind subletal geschädigt, aber nicht nekrotisch. (2) Somit ist ihr Outcome nicht vorabdefiniert; Überleben oder Zelltod ist abhängig davon, ob und wann eine Reperfusion stattfindet. (3) Das initiale neurologische Defizit sollte dem Volumen der Penumbra entsprechen, das Volumen des avitalen Gewebes mit dem klinischen Outcome korrelieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nur das Gewebe der Penumbra durch therapeutische Intervention gerettet werden kann; die Neuronen im Kerngebiet des Infarkts sind – wie oben erwähnt – bereits in den ersten Minuten nach Beginn der Ischämie letal geschädigt.

Bei mehr als 70% aller Patienten kommt es in den ersten Tagen nach Infarkt zu teilweiser oder kompletter Reperfusion. Es kommt darüber hinaus zu einer spontanen Erholung der neurologischen Funktionen in unterschiedlicher Ausprägung. Aus tierexperimentellen Studien weiß man jedoch, dass nur ein signifikanter Anteil des Penumbragewebes überlebt, wenn die Durchblutung innerhalb von 2 Stunden wiederhergestellt wird (Mao et al. 2000); zu einem späteren Zeitpunkt sind bereits alle Neuronen in der Penumbra abgestorben, so dass eine Reperfusion nicht mehr zu einem verbesserten neuronalen Überleben führt.

Das wichtigste therapeutische Ziel in der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls ist deswegen die Rettung der Penumbra durch Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung in diesem Bereich.

Zum momentanen Zeitpunkt besteht die einzige zugelassene Therapie des akuten Schlaganfalls in der systemischen oder lokalen Thrombolyse mit rekombinantem humanen Gewebe-Plasminogen Aktivator (rt-PA) (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. 1995 (Thomassen et

al. 2003). Durch Lyse des gefäßverschließenden Thrombus kann die zerebrale Durchblutung effektiv wiederhergestellt werden, es kommt zu einer signifikanten Verbesserung des Outcomes der betroffenen Patienten. Dennoch kann diese hocheffektive Therapie bis jetzt nur bei weniger als 2% der Schlaganfallpatienten eingesetzt werden (Reed et al. 2001, Hacke et al. 1999). Dies hat zwei Gründe: Erstens gibt es für die rt-PA-Lyse ein kurzes Zeitfenster. Eine Verbesserung des Outcome ist nur dann zu erwarten, wenn das Penumbra-Gewebe noch nicht vollständig abgestorben ist; deswegen verbessert die Lyse-Therapie nur dann den Zustand des Patienten, wenn sie innerhalb von 3 Stunden angewendet wird. Danach sind die prozeduralen Risiken, insbesondere das Blutungsrisiko, so stark erhöht, dass die positiven Effekte der Lyse neutralisiert werden. Darüberhinaus muss vor einer Thrombolysetherapie eine kraniale Bildgebung, meist ein CT, zum Ausschluss einer intrazerebralen Blutung oder eines Schädel-Hirn Traumas durchgeführt werden; dies führt wiederum zu einer Zeitverzögerung, weswegen häufig die Therapie nicht im anvisierten Zeitfenster begonnen werden kann. Die bestehenden therapeutischen Möglichkeiten sind also bei weitem nicht suffizient, sodass weiterhin die dringende Notwendigkeit besteht, neue Therapien zu entwickeln. Ein Hauptziel der aktuellen Schlaganfallforschung besteht darin, das therapeutische Fenster der Thrombolyse zu verlängern, sodass diese Behandlung bei einem größeren Anteil der betroffenen Patienten durchgeführt werden kann.

Neuroprotektive Therapiestrategien, also Substanzen, die den neuronalen Schaden an den minderperfundierten Neuronen der Penumbra verhindern oder mindern sollen, waren zwar im Tierversuch effektiv; bisher konnte sich jedoch noch keine Substanz für den klinischen Gebrauch durchsetzen (Doppenberg et al. 2004).

Mechanistisch erscheint das erfolgversprechendste Therapiekonzept eine Steigerung der zerebralen Durchblutung, und hierbei speziell der Durchblutung in der Penumbra, zu sein. Die Verwendung systemischer Vasodilatoren erschien deswegen zunächst als eine nahe liegende Lösung.

Diese wirken jedoch an allen Gefäßen und führen deswegen zu einer systemischen Hypotension und somit zu einem Abfall der zerebralen Durchblutung, was die ohnehin schon kritische Durchblutung der Penumbra weiter verschlechtert und den Zelltod in dieser Region eher begünstigt.

Eine selektiv zerebrale Anwendung von Vasodilatoren, z. B. die selektive Injektion von Vasodilatoren in die hirnversorgenden Arterien, sollte systemische

Nebenwirkungen mindern. Dies wäre jedoch technisch aufwändig und würde durch den sogenannten „Steal-Effekt“ ebenfalls die Durchblutung der vom verzögerten Zelltod bedrohten Penumbra verschlechtern: Da die normoperfundierten Gefäße der nicht vom Infarkt betroffenen Hirnregionen stärker auf vasodilatierende Stimuli reagieren als die von der Ischämie betroffenen Arterien, würde eine Umverteilung des Blutes zugunsten des normalen Gehirnparenchyms stattfinden.

Die ideale Therapie bestünde in einer selektiven Vasodilatation in der ischämischen Penumbra. Wenn lokale Vasodilatoren nur in diesem Gewebsareal wirken würden, käme es nicht zum „Steal-Effekt“, durch die verbesserte Durchblutung in und um die Penumbra könnten die vom Zelltod bedrohten Neuronen vor dem Absterben bewahrt werden. Sollte diese Durchblutungsverbesserung nur von kurzer Dauer sein, könnte zumindest das Zeitfenster für eine erfolgreiche rt-PA-Lyse verlängert werden. Bisher gibt es jedoch noch keine Möglichkeit, eine derartige selektive Vasodilatation zu bewirken.

Furchgott und Zawadski beschrieben 1980 einen Faktor, der die Acetylcholin-induzierte Gefäßdilataion vermittelt. Da es nur bei intaktem Endothel zu einer Gefäßerweiterung kam, schloss man, dass dieser Faktor aus dem Endothel stammen musste und bezeichnete ihn als EDRF, „endothelial derived relaxing factor“ (Furchgott und Zawadski. 1980). Moncada konnte später zeigen, dass das schnell flüchtige Bioradikal Stickstoffmonoxid mit EDRF identisch ist (Moncada et al. 1991). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses, lösliches Gas mit sehr kurzer biologischer Halbwertszeit, das endogen gebildet wird und auf glatte Muskelzellen stark vasodilatierend wirkt, indem es die Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase und dadurch die intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht.

Im Körper wird NO durch eine Isoenzymgruppe, den NO –Synthasen, aus der Aminosäure L - Arginin gebildet.

Die endotheliale Form (eNOS, Typ I) und die neuronale NOS (nNOS, Typ III) werden als konstitutive Isoformen bezeichnet, da sie NO in Abhängigkeit vom intrazellulären Kalzium-Spiegel produzieren und sich unter Normalbedingungen nachweisen lassen. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, Typ II) kann NO unabhängig vom Ca-Spiegel synthetisieren und tritt hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen auf. Alle drei Isoformen lassen sich im Gehirn nachweisen.

NO ist als Mediator an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt: Neben der Regulation der Gefäßweite und somit der vaskulären Homöostase reguliert es die Thrombozyten – Aktivität (Langford et al. 1994, Radomski et al. 1990, Stamler et al. 1992) und die Leukozytenadhäsion (Akimitsu et al. 1995, Fukatsu et al. 1998, Kanwar et al. 1995, Kubes et al. 1991, Ma et al. 1993, May et al. 1991, Nishida et al. 1994, Niu et al. 1994), es wirkt antiproliferativ (Arnold et al. 1977, Garg et al. 1989, Lincoln et al. 1993, Taguchi et al. 1993) und trägt über eine Modulierung der „endothelial junctions“ zur Regulation der Gefäßpermeabilität bei.

Im Gehirn ist NO für die Aufrechterhaltung der Ruhedurchblutung zuständig, hauptsächlich über die endotheliale NO-Synthase. Auch in der Vermittlung der zerebralen Autoregulation scheint Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle zu spielen (Atochin et al. 2003, Gotoh et al. 2001, Huang et al. 1996, Iadecola et al. 1996, Tanaka. 1996, White et al. 2000, Yamada et al. 2000).

Nach experimenteller fokaler zerebraler Ischämie kommt es nach einem kurzen, wenige Sekunden andauernden NO-Anstieg zu einem deutlichen Abfall der NO-Konzentration gegenüber gesunden Tieren (Shibata et al. 1996, Sugimura et al. 1998), die sich in der Reperfusionsphase normalisiert. Der Abfall erklärt sich durch eine deutliche Abnahme der Aktivität der konstitutiven NO-Synthase-Isoformen, eNOS und nNOS (Grandati et al. 1997, Yoshida et al. 1995).

Stickstoffmonoxid wurde bereits früh nach seiner Entdeckung – und noch bevor man seine genaue Wirkweise kannte - als Medikament für pektanginöse Beschwerden eingesetzt. Organische Nitrate und Nitratderivate werden auch heute noch als Standardmedikation bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. In den aktuellen Leitlinien der kardiologischen Fachgesellschaften (European Society of Cardiology. 2006) werden kurzwirksame NO - Derivate zur Behandlung des akuten Myokardinfarkts sowie des akuten Angina pectoris – Anfalls und länger wirksame Nitrate zur Anfallsprophylaxe empfohlen. Auch bei spastischer Migräne und Gallenwegskoliken nutzt man die vasodilatatorische Wirkung von NO-Derivaten.

Bei anderen Erkrankungen mit vasospastischer Komponente erbrachte die systemische NO-Anwendung keinen therapeutischen Erfolg, so z. B. bei der pulmonalen Hypertonie gleichgültig welcher Genese. Werden hierbei systemische NO - Donatoren oder auch andere Vasodilatoren verwendet, kommt es im

gesamten, also sowohl im systemischen als auch im Lungenkreislauf, zu einer Gefäßerweiterung (Meadow et al. 1986, Rudinsky et al. 1987, Soifer et al. 1988, Stevenson et al. 1979) was zu einer Verschlechterung der Hämodynamik und der Oxygenierung führt. Deswegen suchte man für diese Gruppe der Erkrankungen nach einer Möglichkeit, medikamentös eine rein pulmonale Vasodilatation zu verursachen. Im Zuge der Testung verschiedener Stoffe und Anwendungsformen versuchte man auch die inhalative Anwendung von Stickstoffmonoxid.

Der erste Nachweis, dass die NO-Inhalation spezifisch auf Lungengefäße vasodilatatorisch wirkt, ohne den Blutdruck zu beeinflussen, war bereits 1991 erbracht worden (Frostell et al. 1991). In der Folge konnten diese Ergebnisse an verschiedenen Tierspezies in unterschiedlichen Modellen der pulmonalen Hypertonie reproduziert werden (Fratacci et al. 1991, Hillman et al. 1997, Katayama et al. 1994). Auch beim Menschen mit pulmonalem Hypertonus senkt die NO-Inhalation selektiv den Lungengefäßwiderstand (Pepke-Zaba et al. 1991), ohne eine Wirkung auf den systemischen Blutdruck, der durch den peripheren Gefäßwiderstand reguliert wird, zu haben.

Diese rein pulmonale Wirkung inhalierten NOs führte man darauf zurück, dass das eingeatmete Stickstoffmonoxid augenblicklich von Oxyhämoglobin zu Nitrat umgewandelt und somit inaktiviert wird (Dou et al. 2002, Doyle et al. 1981, Herold et al. 2003). Seit der Entdeckung, dass ERDF NO ist, galt als Dogma, dass oxygeniertes Hämoglobin die Bioaktivität von NO sofort inaktiviert; ein Erhalt der NO-Bioaktivität im Blut erschien unwahrscheinlich (Dou et al. 2002, Doyle et al. 1981, Herold et al. 2003, Hess et al. 1993).

Dennoch mehrten sich mit zunehmender Verbreitung und Erforschung der therapeutischen NO-Inhalation die Hinweise für extrapulmonale iNO-Wirkungen. So wurde 1997 gezeigt, dass NO - Inhalation die Nierendurchblutung, die glomeruläre Filtrationsrate und den Urinfluß verbessert, ohne dass dies durch Veränderungen der systemischen Durchblutung zu erklären war (Troncy et al. 1997). Zudem konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass iNO nicht nur in der Lunge (Cheung et al. 1998) sondern auch im Darm die Leukozytenadhäsion hemmt und antiinflammatorisch wirkt (Ekekezie et al. 2000, Fox-Robichaud et al. 1998). Auch gab es Hinweise, dass die NO - Inhalation die Gerinnung beeinträchtigt (George et al. 1998, Hogman et al. 1994), wobei andere Untersucher diesen Effekt nicht

beobachteten (Albert et al. 1999).

Die Berichte über extrapulmonale iNO-Wirkungen führten dazu, dass verstärkt nach den Mechanismen geforscht wurde, wie die NO-Bioaktivität im Körper nicht nur bewahrt, sondern auch transportiert werden kann.

Eine der Hypothesen war, dass NO an einen Cystein - Rest der  $\beta$  - Untereinheit ( $\beta$  - 93 - Cys) von Hämoglobin bindet (Gow et al. 1998, Stammler et al. 1997). Das so entstandene S - Nitroso - Hämoglobin kann dann das gebundene NO direkt freisetzen oder Plasmaproteine (Patel et al. 1999, Wolzt et al. 1999) nitrosylieren, die es dann abgeben. Beim Übergang vom oxygenierten in den desoxygenierten Zustand erfolgt im Hb-Molekül eine Konformationsänderung. Dadurch kommt es zu einer Schwächung der NO-Hb-Bindung, was zur bevorzugten NO-Freisetzung in Gebieten mit niedriger Sauerstoffspannung führt (Jia et al. 1996, McMahon et al. 2002).

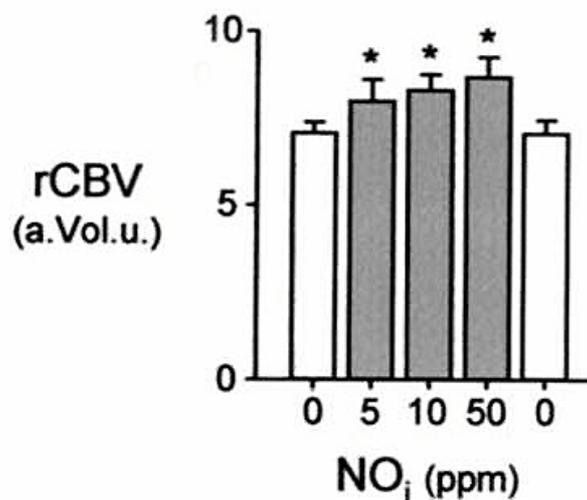
Andere Untersucher verwiesen darauf, dass es unter iNO zu einem Anstieg von Plasma - Nitrit komme (Gladwin et al. 2000). Ähnlich wie S - NO - Hb könnte auch Nitrit die Bioaktivität von NO bewahren (Zweier et al. 1995): Einerseits kann Desoxyhämoglobin als Nitrit - Reduktase fungieren und Nitrit zu NO umwandeln (Gladwin et al. 2004), andererseits existieren auch enzymatische und nichtenzymatische Reaktionswege, welche beide bevorzugt bei niedrigem  $pO_2$  und pH - Wert ablaufen (Godber et al. 2000, Li et al. 2003, Zhang et al. 1998, Zweier et al. 1995). Somit würde auch durch diesen Mechanismus die Stickstoffmonoxid - Wirkung bevorzugt in hypoxischen Arealen auftreten.

Nachdem erste extrapulmonale Wirkungen der NO-Inhalation beschrieben wurden, wurde intensiv auch nach iNO-bedingten Veränderungen der zerebralen Funktion gesucht. Bei Neugeborenen, die aufgrund von Herzfehlern mit iNO behandelt wurden, wurden vereinzelt unter der Therapie auftretende, reversible EEG-Veränderungen beschrieben (Jia et al. 1996, Moenkhoff et al. 1998); im Tierversuch konnte dieses Phänomen mit unterschiedlichen iNO-Dosierungen nicht nachgewiesen werden (Lopes Cardozo et al. 1996). Auch ist es fraglich, ob iNO die Rate intrazerebraler Blutungen bei Neugeborenen erhöht (Cheung et al. 1998).

Großes Interesse galt in diesem Zusammenhang der zerebralen Durchblutung: Hierbei zeigte in den tierexperimentellen Studien kein Einfluss von iNO (Cheung et

al. 1998, Lopes Cardozo et al. 1996), somit scheint eine Beeinflussung der Weite der zerebralen Widerstandsgefäße durch die NO-Inhalation unwahrscheinlich.

Kübler (Kuebler et al. 2003) konnte jedoch nachweisen, dass es unter NO - Inhalation zu einer reversiblen, dosisabhängigen Steigerung des zerebralen Blutvolumens kommt. Bei gleich bleibender zerebraler Durchblutung kann dies nur durch eine Dilatation der zerebralen Venolen, die als Kapazitätsgefäße fungieren, erklärt werden.



**Abb. 1-1:** Nach NO - Inhalation in Schweinen kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg des zerebralen Blutvolumens. Abbildung modifiziert nach Kuebler. (Kuebler et al.2003).

Die Mechanismen der Steigerung des zerebralen Blutvolumens, ein unter physiologischen Bedingungen vernachlässigbarer Parameter, durch iNO blieben jedoch völlig unklar. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt scheint im unterschiedlichen Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) des arteriellen und des venösen Stromgebiets zu liegen. Die oben aufgezählten möglichen Wege des NO-Weitertransports zeigen jeweils eine deutliche Abhängigkeit vom lokalen  $pO_2$ : Die NO-Abgabe ins Gewebe erfolgt bevorzugt unter hypoxämischen Bedingungen, wie sie – relativ zu den Arterien gesehen – im venösen Stromgebiet vorliegen. Auf das Gehirn bezogen erscheint deswegen eine durch iNO ausgelöste venöse

Vasodilatation und somit ein Anstieg des zerebralen Blutvolumens möglich.

Das Hauptziel der vorliegenden Studie war deswegen, den von Kübler und Mitarbeitern hypothetisierten Effekt der NO-Inhalation auf die zerebrale Mikrozirkulation experimentell zu überprüfen und mechanistisch aufzuklären.

Basierend auf Befunden aus dem ersten Teil der Arbeit sollte in einem zweiten Schritt die Wirkung der NO-Inhalation nach fokaler zerebraler Ischämie untersucht werden: Hierbei gibt es neben dem arteriovenösen Sauerstoffpartialdruck-Gradienten auch einen Unterschied im  $pO_2$  zwischen normal perfundierten Gefäßen und den Arterien der ischämischen Penumbra. Dadurch könnte es zu einer selektiven Vasodilatation und Verbesserung der zerebralen Durchblutung in mangeldurchbluteten Hirnarealen („Penumbra“) kommen und der post-ischämische Hirnschaden vermindert werden.

### **Fragestellung**

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Wirkung von inhaliertem Stickstoffmonoxid auf die zerebrale Mikrozirkulation zu untersuchen. Im Mausmodell sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ein experimentelles Tiermodell zur Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation unter besonderer Berücksichtigung von Ausmaß und Kinetik der Wirkung von iNO sollte etabliert werden.
2. Die Akutwirkung der NO-Inhalation beim gesunden Tier sollte unter physiologischen Bedingungen kurz- und langfristig quantifiziert werden. Dabei sollte die Wirkung auf den Durchmesser gesunder zerebraler Gefäße in der Intravitalmikroskopie untersucht werden.
3. Findet sich in Bezug auf die NO-Inhalations-Wirkung eine Dosis-Abhängigkeit?
4. Können iNO- Effekte durch die Gabe spezifischer Inhibitoren gehemmt werden?
5. Kann die iNO-Wirkung durch die Gabe spezifischer Indikatoren sichtbar gemacht werden?
6. Die NO-Inhalation sollte in Hinblick auf ihr therapeutisches Potenzial bei der fokalen zerebralen Ischämie evaluiert werden. Hierfür sollten die kurzfristigen

iNO-Wirkungen mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und die langfristigen histologisch untersucht werden.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von 2002 bis 2006 im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians Universität München mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsvorhaben AZ 211-2531-3-21/02 und AZ 211-2531-49/03) durchgeführt.

### **2.1 Versuchstiere**

Alle Experimente wurden an männlichen Mäusen des Stamms C57/Bl6 durchgeführt. Die Tiere wurden im Institut für Chirurgische Forschung gezüchtet oder von Charles River Deutschland bezogen. Zucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Richtlinien der Europäischen Union. Die Mäuse hatten ein Mindestalter von acht Wochen und ein Körpergewicht von 25-30g.

### **2.2 Experimentelle Modelle**

#### **2.2.1 Narkose**

Die Narkose wurde mit einer 3-fach Kombination aus Medetomidin (0,5 mg/kg K.G., Domitor®, Dr. E. Graeb AG, Basel, Schweiz), Fentanyl (0,05 mg/kg K.G., Janseen-Cilag, Neuss) und Midazolam (5 mg/kg K.G., Dormicum®, Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde alle 60 Minuten ein Drittel der initialen Dosis i.p. appliziert. Zur Beendigung der Narkose wurden folgende Antagonisten intraperitoneal gegeben: Atipamezol (2,5 mg/kg K.G., Antisedan®, Pfizer GmbH, Karlsruhe), Flumazenil (0,5 mg/kg K.G., Anexate®, Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und Naloxon (1,2 mg/kg K.G., Omresa Arzneimittel GmbH, Freiburg).

#### **2.2.2 Regelung der Körpertemperatur**

Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer rückgekoppelten rektalen Temperatursonde und einer Heizmatte bei 37°C konstant gehalten.

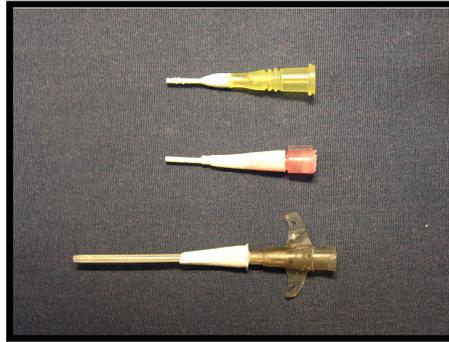
### **2.2.3 Intubation und Ventilation**

Da das Narkoseprotokoll keine ausreichende Spontanatmung gewährleistete, mußten die Versuchstiere intubiert und kontrolliert beatmet werden. Die Intubation erfolgte in 45°Kopfhochlagerung unter Sicht mit Hilfe eines OP-Mikroskops (OPMi-1, Zeiss, Deutschland). Als Tubus wurde eine Eigenkonstruktion (Abb. 2-1) aus einem 24 oder 20 G Venenverweilkatheter (Insyte®, Decton Dickinson, U.S.A oder Jelco winged i.v. Catheter, Johnson & Johnson, U.S.A) mit einem Kragen aus Silikon zur Abdichtung der Stimmritze (RTV Silikon, Deutschland) verwendet. Sofort nach Intubation wurden die Versuchstiere an einen Kleintierrespirator (Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March, Germany) angeschlossen und mit 140-200 Atemzügen/min bei einem festen Inhalation-Expirations Verhältnis von 1:1 bei einem Atemzugsvolumen von 200 µl mit Raumluft unter Zusatz von Sauerstoff (Volumenanteil Sauerstoff: 38 %) ventiliert. Der Sauerstoffgehalt wurde kontinuierlich oximetrisch (Oxidig, Drägerwerke AG, Lübeck) kontrolliert.

### **2.2.4 Mikrokapnometrie**

Um eine korrekte Ventilation der Versuchstiere zu gewährleisten, wurde der endexpiratorische CO<sub>2</sub> (EtCO<sub>2</sub>) gemessen. Der EtCO<sub>2</sub> korreliert in einem hohen Maße mit dem arteriellen CO<sub>2</sub>, einem Parameter, der maßgeblich an der zerebralen Gefäßweitenregulation beteiligt ist. Der EtCO<sub>2</sub>, der nicht-invasiv gemessen werden kann, eignet sich somit hervorragend dafür diesen für die Untersuchung zerebraler Gefäße entscheidenden Wert zu bestimmen und durch entsprechende Veränderungen der Ventilation zu regulieren.

Die Messung des EtCO<sub>2</sub> erfolgte mit einem Mikrokapnometer der Firma Columbus, dem einzigen Gerät, das auf Grund seines kleinen Messvolumens (< 5-20 ml/min) bei Mäusen eingesetzt werden kann (Micro-CapnoGraph CI240 Monitor, Columbus Instruments, Ohio, USA). Die Mikrokapnometermesssonde wurde unmittelbar am Ausgang des Tubus platziert, so dass eine Vermischung von Ein- und Ausatemluft an der Messsonde vermieden werden konnte. Das Gerät saugte kontinuierlich Luft aus dem Atemstrom des Versuchstiers, die dann mit einem Infrarot Gas Sensor analysiert wurde. Auf Grund der hohen Messfrequenz des Geräts kann der EtCO<sub>2</sub> kontinuierlich gemessen und angezeigt werden.



**Abb. 2-1:** Selbst gebaute Tuben für die Intubation und mechanische Ventilation von Mäusen (gelber und rosa Tubus, oben) im Vergleich zu einem Eigenbau-Tubus, der für Ratten verwendet wird (unten).

### 2.2.5 Arterieller und venöser Zugang

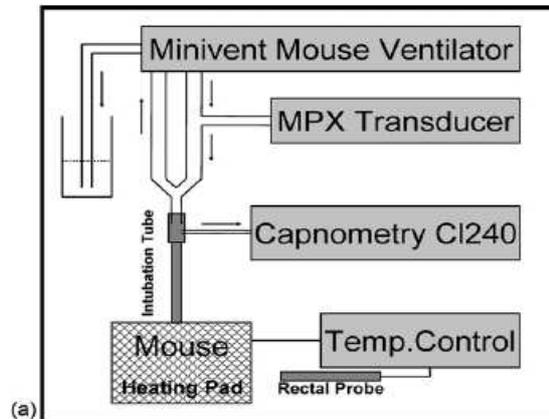
Zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks wurde den Tieren ein heparinierter Kunststoffkatheter (Außendurchmesser: 0,61 mm; Innendurchmesser: 0,28 mm; Fa. Portex, Hythe, England) in die linke A. femoralis gelegt. Der Katheter wurde kontinuierlich mit isotoner Kochsalzlösung (0,4 ml/h, Fresenius, Bad Homburg) gespült und war an einen Druckaufnehmer (DTX Plus, Fa. Spectramed, Düsseldorf) angeschlossen. Mit Hilfe eines Messaufnahmesystems (DASYLab, National Instruments, München) und entsprechender Verstärkung (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) konnte der arterielle Blutdruck gemessen, aufgezeichnet und online dargestellt werden.

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

### 2.2.6 Blutgasanalyse

Für die Überprüfung der Blutgase und der Serumelektrolyte wurden jeweils kurz vor Beginn und am Ende des Versuchs je 0,6 ml arterielles Blut mit einer heparinbeschichteten Kapillare (Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland) abgenommen. Mit einem Blutgasanalysegerät (Typ 860, Chiron Diagnostics,

München) wurden folgende Parameter gemessen: pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, [Na<sup>+</sup>], [K<sup>+</sup>], [Ca<sup>2+</sup>], [Cl<sup>-</sup>], [Glukose] und [Laktat].



**Abb. 2-2:** Schematische Darstellung des Ventilationssetups. Abbildung modifiziert nach Thal und Plesnila (Thal und Plesnila, 2007).

### 2.2.7 Laser Doppler Fluxmetrie

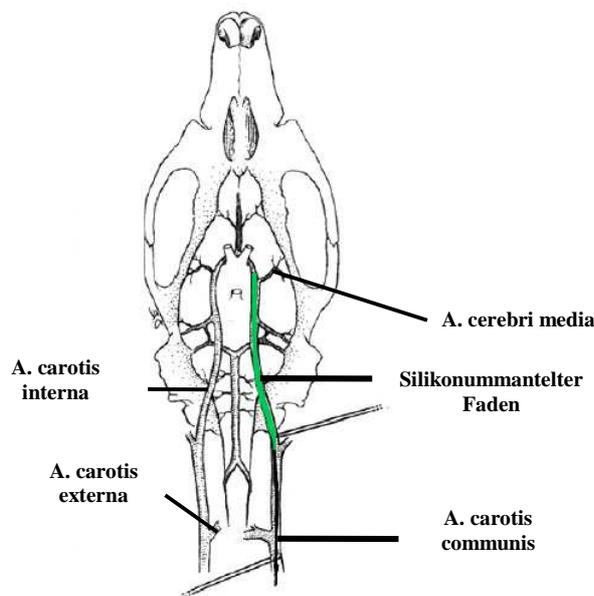
Die regionale zerebrale Durchblutung (regional cerebral blood flow, rCBF), ein entscheidender Kontrollparameter bei der Durchführung von Versuchen zur zerebralen Ischämie, wurde nicht-invasiv durch die intakte Schädeldecke mit Laser Doppler Fluxmetrie (Perimed, Stockholm, Sweden) gemessen (Kataoka, H. et al 2004; Plesnila, N. et al. 2001). Die Laser Doppler Fluxmetrie misst über den Dopplershift die Geschwindigkeit und über die Absorption des eingestrahnten Laserlichts die Erythrozytenkonzentration im jeweiligen Messvolumen. Das Produkt aus beiden Werten wird in Perfusionseinheiten (perfusion units, PU) angegeben, einem Wert der ausgezeichnet mit der zerebralen Durchblutung korreliert. Der rCBF wurde je nach experimentellem Aufbau und Fragestellung entweder im Kerngebiet oder im Randbereich des Versorgungsgebiets der A. cerebri media Gebiet gemessen.

### **2.2.8 Zerebrale Oligämie**

Um die zerebrale Durchblutung auf oligämische (30-40% des Ausgangswerts) oder ischämische (<20% des Ausgangswerts) Werte vermindern zu können, wurden beide Aa. carotis communis angeschlungen und durch entsprechenden Zug teilweise oder komplett verschlossen. Zunächst wurde die Haut zwischen Unterkiefer und Manubrium sterni mit einem medianen Schnitt eröffnet. Die Glandulae mandibulares und das Unterhautfettgewebe wurden mobilisiert. Die beiden Aa. carotides communes wurden ihrem Verlauf entlang der Trachea dargestellt. Dabei wurde besonderer Wert darauf gelegt, dass umliegende Strukturen, z.B. der truncus vagosympathicus und der N. phrenicus, nicht verletzt wurden. Erst dann wurden die beiden Gefäße mit einem monofilen Kunststoffaden (Stärke 5-0, FA, Ethicon, Nordersted) angeschlungen. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Präparation keine Reduktion oder Unterbrechung der zerebralen Durchblutung hervorrief. Die zerebrale Durchblutung wurde mit Laser-Dopplerfluxmetrie (Perimed AB, Järfälla, Schweden) gemessen.

### **2.2.9 Verschuß der A. cerebri media (MCA Okklusion)**

Die transiente fokale zerebrale Ischämie wurde durch Verschluss der A. cerebri media hervorgerufen (Kataoka, H. et al 2004, Plesnila, N. et al. 2001). Mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Vergrößerung: 10-40-fach) wurde ein Mittellinienschnitt am Hals des Versuchstiers durchgeführt und die linke A. carotis communis dargestellt. Die A. carotis externa wurde mobilisiert, ligiert und mit einer Mikroschere eröffnet. Anschließend wurde ein 11 mm langer und an der vorderen Spitze zu 3/4 silikonummantelter monofiler 8-0 Faden (Ethilon Black Monofilament Nylon 1716, Ethicon, USA) in die A. carotis interna eingeführt und nach intrakraniell vorgeschoben bis die Laser Doppler Messung über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media den suffizienten Verschluss dieses Gefäßes anzeigte (CBF <20% vom Ausgangswert).



**Abb.2-3:** Schematische Darstellung des Modells der fokalen zerebralen Ischämie bei der Maus. Die A. carotis communis und externa wurden ligiert und die A. carotis interna mit einem Mikrogefäßclip verschlossen. Der Okklusionsfaden (grün) wurde in die A. carotis communis eingeführt und nach Entfernung des Clips über die A. carotis interna in den Circulus Willisii vorgeschoben, bis die A. cerebri media verschlossen wurde. (Abbildung modifiziert nach Plesnila).

### 2.2.10 Histologie

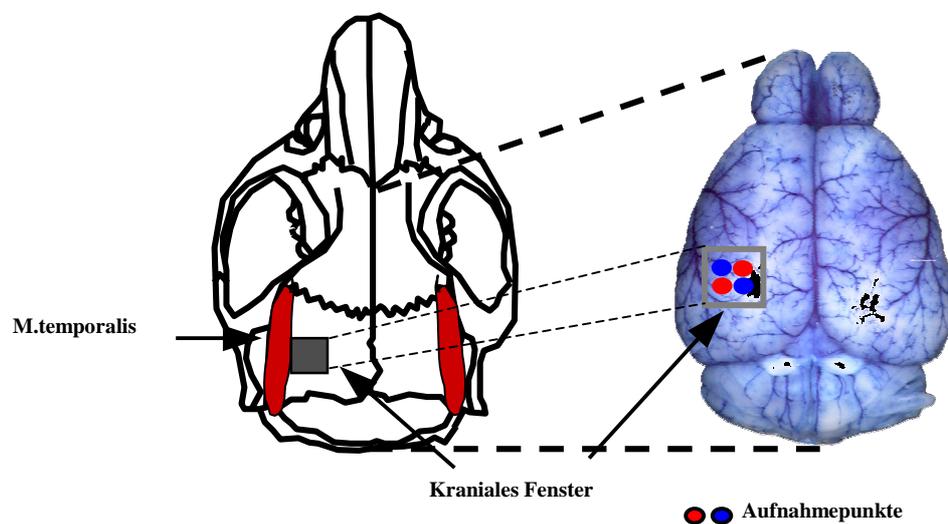
Der Schweregrad des ischämischen Hirnschadens wurde histomorphometrisch an Hand von Nissl-gefärbten koronaren Hirnschnitten bestimmt. Für diesen Zweck wurden die Versuchstiere mit 4%iger Phosphat-gepufferter (pH 7,4) Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert. Der Thorax wurde in tiefer Narkose eröffnet, der linke Herzventrikel mit einem stumpfen Venenpunktionsbesteck (25 ST) punktiert und das rechte Atrium mit einem Scherenschlag eröffnet. Das Gefäßsystem wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, bis das Effluat aus dem Atrium klar wurde. Anschließend wurde das Gehirn sorgfältig aus dem Kranium freipräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in 4%iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt. Das Gewebe wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und

in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke koronare Serienschnitte angefertigt und mit Kresylviolett (Nissl-Färbung) gefärbt.

### 2.2.11 Transdurales Schädelfenster

Das Versuchstier wurde in Bauchlage in eine stereotaktische Halterung (Mod. 51600, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) eingespannt. Nach medianem Hautschnitt über der parietalen Kalotte wurden die Hautränder mit Seidenfäden (Stärke 5-0, Fa, Ethicon, Nordersted) aufgespannt. Mit einem elektrischen Bohrer (Rewatronik, München) wurde unter Schonung der Dura mater die Kalotte unter kontinuierlicher Kühlung rechteckig abgefräst. Dadurch wurde ein rechteckiges 2 x 2 mm großes Schädelfenster über dem linken parietalen Kortex angelegt durch das die zerebrale Mikrozirkulation beobachtet werden konnte. Bei Verletzungen der Dura mater wurde das Tier vom Versuch ausgeschlossen.

Das kraniale Fenster wurde mit 37°C warmer Kochsalzlösung superfundiert, um eine lokale Auskühlung des Hirngewebes zu vermeiden.



**Abb.2-4:** Schematische Darstellung der Position des kranialen Fensters zur Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation bei der Maus. Das Fenster liegt über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media, deren terminale Äste im Schädelfenster zu sehen sind (rechte Abbildung). Die blauen und roten Punkte kennzeichnen die Hirnregionen, in denen der Durchmesser zerebraler Venen und

*Arterien mit Intravitalmikroskopie bestimmt wurde (Abbildung modifiziert nach Plesnila).*

### **2.2.12 Visualisierung pialer Gefäße**

Die Visualisierung pialer Gefäßen erfolgte durch intravenöse Applikation (0,1 ml einer 0,5% Lösung) des Fluoreszenzfarbstoffs Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran; Sigma, Deisenhofen). Durch Kopplung an Dextran (Molekulargewicht: 150 kDa) verblieb der Farbstoff intravasal und färbte ausschließlich das Plasma an. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

### **2.2.13 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie zerebraler Gefäße**

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde ein für diese Zwecke angefertigtes Epifluoreszenzmikroskop verwendet (Orthoplan, Leitz GmbH, Wetzlar), das mit einer Quecksilberdampflampe, einer hochsensitiven, Silikon-verstärkten Videokamera und einem besonders großen und beweglichen Mikroskoptisch ausgestattet war (Hamamatsu Photonics, Herrsching). Der Mikroskoptisch verfügte über ein Kugelgelenk, so dass die Hirnoberfläche parallel zum Objektiv ausgerichtet werden konnte und über einen Schrittmotor-gesteuerten Kreuztisch (IXE.C, phytron, Gröbenzell), der das Wiederfinden eingestellter Gefäßabschnitte mit einer Genauigkeit von 1 µm erlaubte. Für die Epifluoreszenz wurden Ploemopak Filterblöcke (Leica, München) und 10x (NA 0,2) oder 25x (NA 0,6) Salzwasser-immersionsobjektive verwendet (Leitz GmbH, Wetzlar).

Das Versuchstier wurde in einer stereotaktischen Halterung fixiert und nach Intubation und Anbringen verschiedener Messsonden unter das Mikroskop gelagert. Geeignete Areale der pialen Mikrozirkulation auf der parietalen Hirnrinde wurden zunächst mit der Übersichtsvergrößerung (Objektiv: 10x) aufgesucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Blutgefäße der Kortexoberfläche nicht von größeren Blutgefäßen der Dura mater verdeckt wurden und die im Bildausschnitt beobachteten Gefäße möglichst in einer Fokusebene lagen. Danach wurden mit der höheren Vergrößerung (Objektiv: 25x) Areale und deren Koordinaten zum Beginn der Aufzeichnungsphase festgelegt. Dadurch konnten die identischen Gefäßareale zu

der im Protokoll festgelegten Zeit quantitativ analysiert werden. Bei jedem Versuchstier wurde ein Gebiet mit einer Arteriole und einer Venole in Nachbarschaft zueinander, je ein Gebiet mit einer größeren und einer kleineren Venole in Nachbarschaft zueinander, je ein Gebiet mit einer größeren und einer kleineren Venole, sowie ein Gebiet mit überwiegend kapillären Gefäßen untersucht. Jedes Areal wurde zehn Sekunden aufgezeichnet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München) mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde auf S-VHS Videobändern (MQSE-120, Sony, Köln) aufgezeichnet. Über einen Videozeitgenerator wurden simultan Datum und Uhrzeit in das Videobild eingespielt. Die Aufnahmen konnten simultan mit einem Trinitron Farbvideomonitor (PVM-2730 QM, Sony, Köln) in 930-facher Vergrößerung betrachtet werden.

#### **2.2.14 Stickstoffmonoxid (NO) Inhalation (NOi)**

Stickstoffmonoxid (NO; 268 mg/m<sup>3</sup> in N<sub>2</sub>; Linde, Deutschland) wurde so mit Sauerstoff und Stickstoff gemischt, dass das Versuchstier mit einer Endkonzentration von 50 ppm beatmet wurde (36% O<sub>2</sub> und 64% N<sub>2</sub>). Die NO Konzentration wurde kontinuierlich mit einem elektrochemischen Gasmonitor (ITX Mehrfachgas Monitor, Siegrist, Deutschland) gemessen.

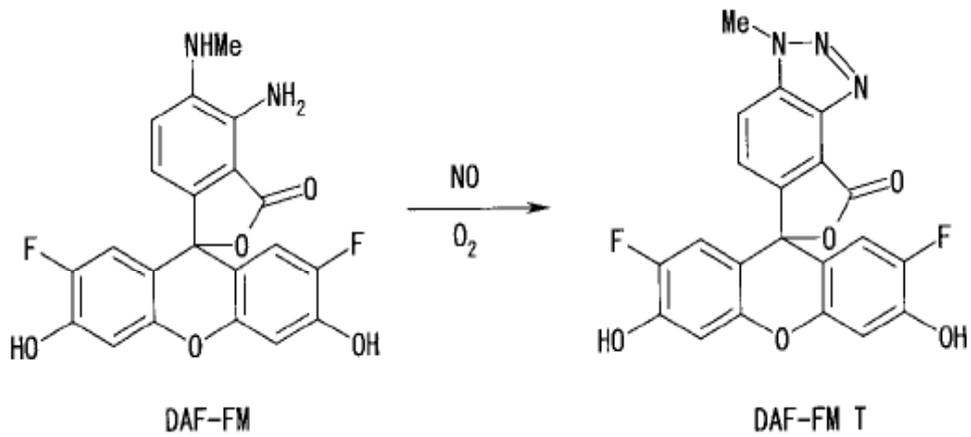
#### **2.2.15 Hemmung der Guanylyl Cyclase**

Für die selektive Hemmung der Guanylyl Cyclase, dem Enzym, das für die NO-abhängige Bildung von zyklischem GMP in glatten Gefäßmuskelzellen verantwortlich ist, wurde 1H-[1,2,4]oxadiazolol[4,3-a]quiNOxalin-1-one (ODQ; Sigma, Deisenhofen) verwendet. ODQ wurde in Ethanol gelöst und dann mit 0,9% NaCl auf eine Endkonzentration von 10 µM verdünnt (Ethanolendkonzentration: 0,5%).

#### **2.2.16 Messung von NO in situ**

Für die Messung von NO in situ wurde der NO selektive Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM Diazetat (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat) verwendet. DAF-FM wurde in 0,9% NaCl gelöst und in einer Endkonzentration von 5 µM auf die exponierte Hirnoberfläche pipettiert. Überraschenderweise akkumulierte DAF-FM

selektiv in zerebrovaskulären Endothelzellen. Die Messung erfolgte 20 min nach Applikation des Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm.

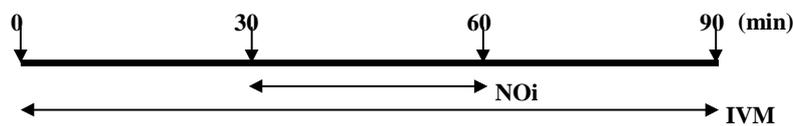


**Abb.2-5:** Schematische Darstellung der Reaktion von DAF-FM mit NO. Aus Kojima et al. 1999.

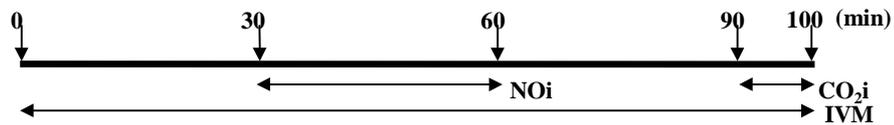
### 2.3 Versuchsprotokolle

Für die vorliegende Arbeit wurden Untersuchungen sowohl unter physiologischen (Abb. 2-6) als auch unter pathologischen Bedingungen (Abb. 2-7) durchgeführt.

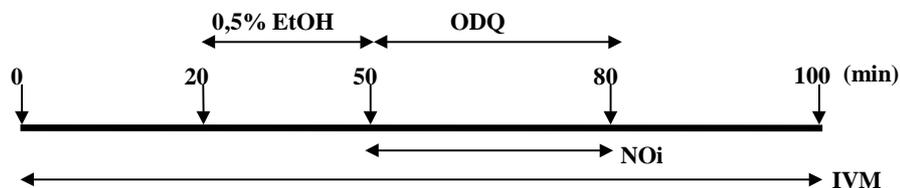
a. Inhalation von NO (50 ppm)



b. Inhalation von NO (50 ppm) und CO<sub>2</sub> (10%)

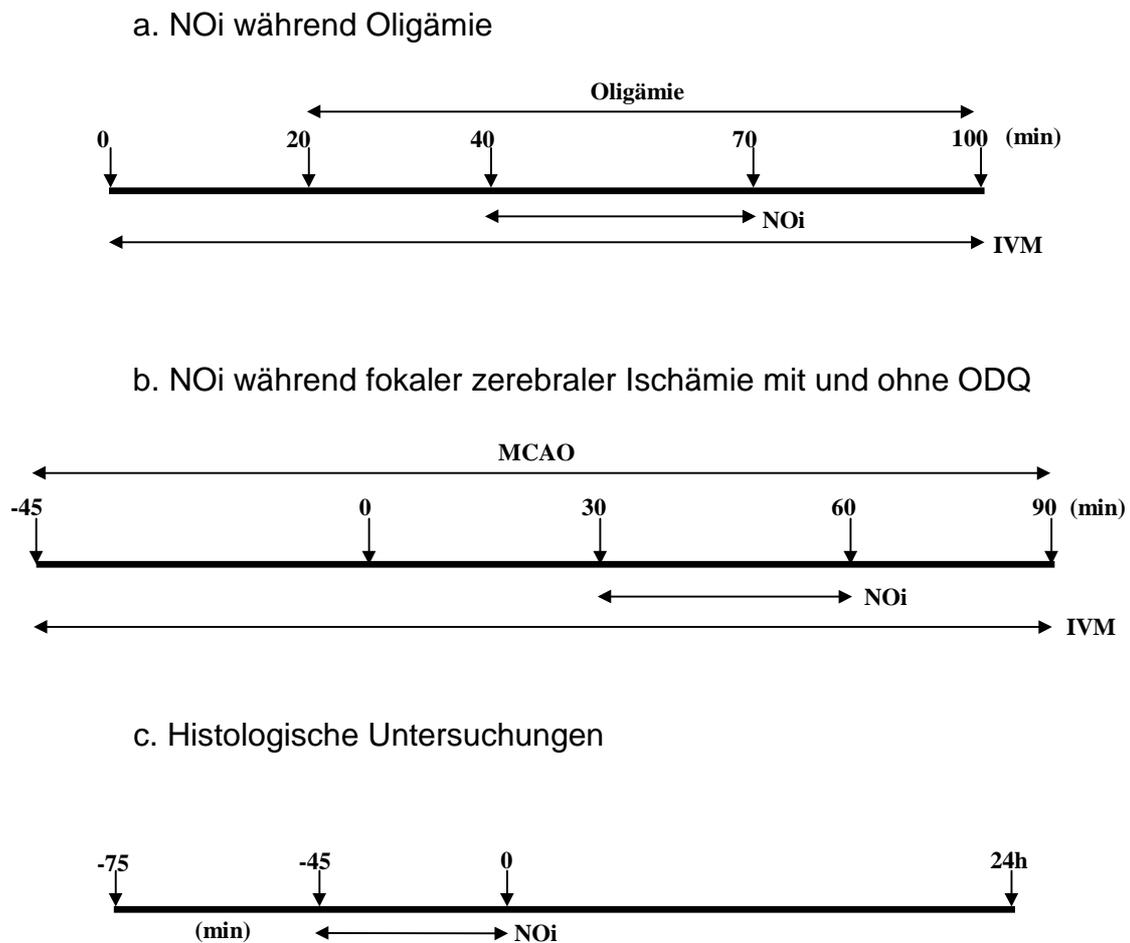


c. Inhalation von NO (50 ppm) und CO<sub>2</sub> (10%) mit und ohne ODQ



**Abb. 2-6:** Versuchsprotokolle unter physiologischen Bedingungen.

Zeitpunkt 0 min: Anfang der Aufnahmen. NO<sub>i</sub>: NO-Inhalation. IVM: Intravitalmikroskopie. CO<sub>2i</sub>: CO<sub>2</sub> Inhalation. ODQ: Superfusion mit ODQ.



**Abb. 2-7:** Versuchsprotokoll unter pathologischen Bedingungen. Zeitpunkt 0 min: Beginn der Aufnahmen. NOi: NO-Inhalation. MCAo: Okklusion der A. cerebri media.

Die Größe jeder Versuchsgruppe betrug n=5 bis 7.

## 2.4 Analyse

### 2.4.1 Quantitative Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Sequenzen wurden auf Videoband aufgenommen so dass die quantitative Auswertung nach Beendigung der Versuche erfolgen konnte. Für die Auswertung wurden die Videosequenzen auf einem Videomonitor (PVM-2730 QM, Sony, Köln) wiedergegeben. Bei Bedarf konnten einzelne Bilder mit Hilfe einer Videokarte (Matrox, Dorval, Kanada) digitalisiert werden.

Der Gefäßdurchmesser wurde mit einem PC-basierten Bildverarbeitungsprogramm (CapImage, Ingenierbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) bestimmt. Auf dem verwendeten 15 Zoll Bildschirm wurde eine 790-fache Vergrößerung erreicht. Die Auflösung des PAL Videosystems liegt bei 768 x 576 (Breite x Höhe) Pixeln. Damit lag die auf dem Bildschirm dargestellte Pixelgröße bei 0,7067 µm horizontal und 0,5155 µm vertikal. Hieraus ergibt sich eine Genauigkeit für die Bestimmung der Gefäßdurchmesser von  $\pm 1,4$  µm. Als Gefäßgrenze galt der Übergang vom hell, durch FITC-Dextran gefärbten Plasma, zum nicht angefärbten Endothel. Zu den verschiedenen Untersuchungszeiten wurden stets dieselben Gefäßsegmente vermessen. Das Bildverarbeitungsprogramm erlaubte die Markierung dieser Grenze und summierte die Anzahl der Pixel zwischen den Markierungen zu einer Gesamtstrecke. Jede Messung wurde drei Mal durchgeführt und der Mittelwert dieser Messungen wurde protokolliert.

## **2.5 Einschlusskriterien**

Nach Abschluss der Präparation wurden für die weitere intravitalmikroskopische Untersuchung bei allen Versuchstieren folgende Einschlusskriterien aufgestellt:

- Arterieller Mitteldruck > 60 mmHg
- Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>): 35-45 mmHg
- Fehlen von Mikro- und Makrohämorrhagien
- Keine Verletzung der Dura mater

Auf Grund dieser Kriterien mussten in der vorliegenden Studie nach der Präparation 30% der Versuchstiere ausgeschlossen werden.

## **2.6 Statistik**

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für alle statistischen Berechnungen wurden nicht-parametrische Verfahren verwendet. Verbundene Messungen wurden mit dem Friedman Test,

nicht-verbundene mit dem Mann-Whitney Test analysiert. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0.05$  angenommen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 NO-Inhalation (NOi) unter physiologischen Bedingungen

##### 3.1.1 Physiologische Parameter

Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit NO-Inhalation (NOi) bestand kein Unterschied hinsichtlich des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP), der in beiden Gruppen einen geringen und nicht signifikanten Abfall im Zeitverlauf zeigte (Tab. 3-1). Bei den Blutgaswerten war der  $pO_2$  in der NOi-Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe ohne statistische Signifikanz zu erreichen, ansonsten bestand hinsichtlich der Blutgaswerte kein Unterschied zwischen den Gruppen. Der pH zeigte in beiden Gruppen einen nicht signifikanten Abfall im Zeitverlauf (Tab. 3-2).

#### MAP [mmHg]

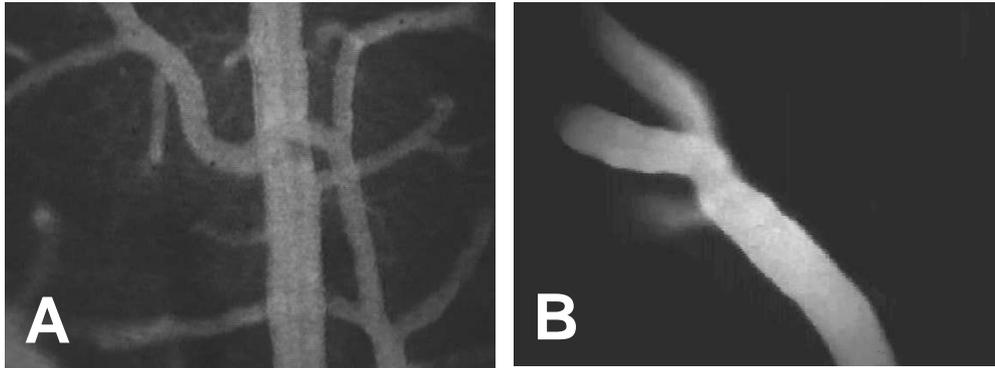
Zeit [min]	-20	-10	0	10	20	30	40	50	60
<b>Kontrolle</b>	69± 2.1	67.7± 3.9	66.8± 1.9	65.5± 2.4	65.6± 3.0	65.8± 3.1	64± 1.6	61.6± 1.5	61.8± 1.8
<b>NOi</b>	79.0± 7.9	77.3± 7.6	73.7± 6.5	70.2± 4.8	68.2± 5.6	68.2± 3.8	68.4± 3.4	69.6± 4.3	68.6± 4.3

**Tab. 3-1:** Darstellung des MAP [mmHg] in der Kontrollgruppe (n=6) und der NOi-Gruppe (n=6) im Zeitverlauf. Zum Zeitpunkt 5 Min. beginnt in der NOi-Gruppe die NO-Inhalation (MW ± SD).

Zeit [min]	pH		$pO_2$ [mmHg]		$pCO_2$ [mmHg]	
	0	60	0	60	0	60
<b>Kontrolle</b>	7.37± 0.05	7.27± 0.09	102.10± 21.93	101.45± 30.17	37.93± 3.74	37.23± 5.51
<b>NOi</b>	7.34± 0.03	7.24± 0.03	79.88± 4.61	84.25± 7.24	37.32± 4.99	37.83± 2.99

**Tab. 3-2:** Darstellung des pH,  $pO_2$  [mmHg] und  $pCO_2$  [mmHg] in der Kontrollgruppe (n=7) und der NOi-Gruppe (n=7) zu den Zeitpunkten 0 (in der NOi-Gruppe vor Beginn der Inhalation) und 60 Minuten (in der NOi-Gruppe nach Ende der NO-Inhalation, MW ± SD).

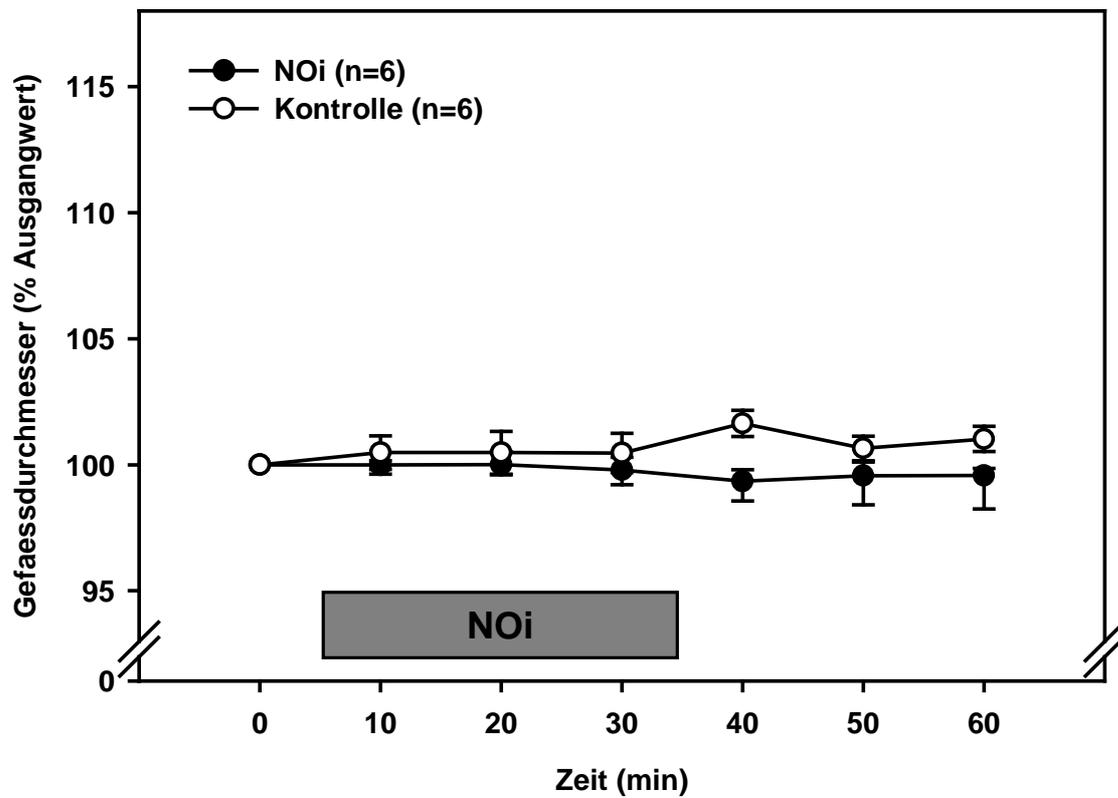
### 3.1.2 Intravitalmikroskopische Beobachtungen



**Abb. 3-1:** Exemplarische Darstellung intravitalmikroskopischer Aufnahmen jeweils einer Arteriole und Venole in 10-facher Vergrößerung (A, Arteriole links im Bild mit größerem Gefäßdurchmesser, Venole rechts im Bild) und einer Arteriole in 25-facher Vergrößerung (B) in einem Kontrolltier.

#### 3.1.2.1 Arteriöläre Gefäßdurchmesser

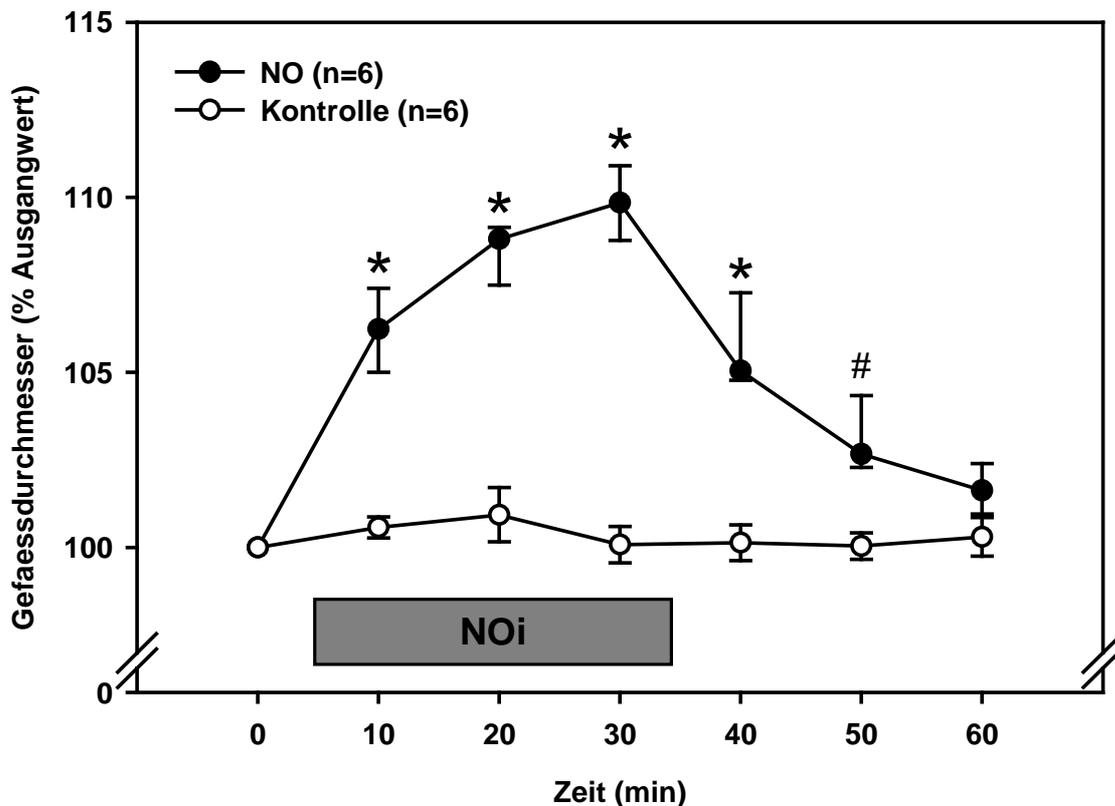
In jeweils 6 Versuchstieren wurden 9 Arteriolen in der Kontrollgruppe und 16 Arteriolen in der NOi-Gruppe analysiert. Hier zeigte sich, dass sich die arteriölären Gefäßdurchmesser durch die NO-Inhalation nicht ändern und auch in der Kontrollgruppe über den Beobachtungszeitraum konstant bleiben (Abb. 3-2).



**Abb. 3-2:** Arteriöläre Gefäßdurchmesser vor, während und nach der Inhalation mit NO (30 Minuten, 50 ppm) und in der Kontrollgruppe ohne NO-Inhalation. Die NOi führt zu keiner Veränderung der arteriölären Gefäßdurchmesser im Zeitverlauf (MW  $\pm$  SEM).

### 3.1.2.2 Venoläre Gefäßdurchmesser

In jeweils 6 Versuchstieren wurden 25 Venolen in der Kontrollgruppe und 24 Venolen in der NOi-Gruppe analysiert. Hier zeigte sich, dass es mit Induktion der NOi zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikanten Zunahme der venolären Gefäßdurchmesser um bis zu 10% kommt. Die Dilatation der Venolen bildet sich mit Beendigung der NOi nur langsam zurück. Die venolären Gefäßdurchmesser bleiben in der Kontrollgruppe während des Beobachtungszeitraumes konstant (Abb. 3-3).



**Abb. 3-3:** Venoläre Gefäßdurchmesser vor, während und nach der Inhalation mit NO (30 Minuten, 50 ppm) und in der Kontrollgruppe ohne NO-Inhalation. Die NOi führt zu einer sofortigen und im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikanten venolären Dilatation um bis zu 10% des Ausgangsdurchmessers, die sich nach Beendigung der NOi nur langsam wieder zurückbildet (\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle, # $p < 0.03$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).

## 3.2 NOi mit anschließender CO<sub>2</sub>-Inhalation unter physiologischen Bedingungen

### 3.2.1 Physiologische Parameter

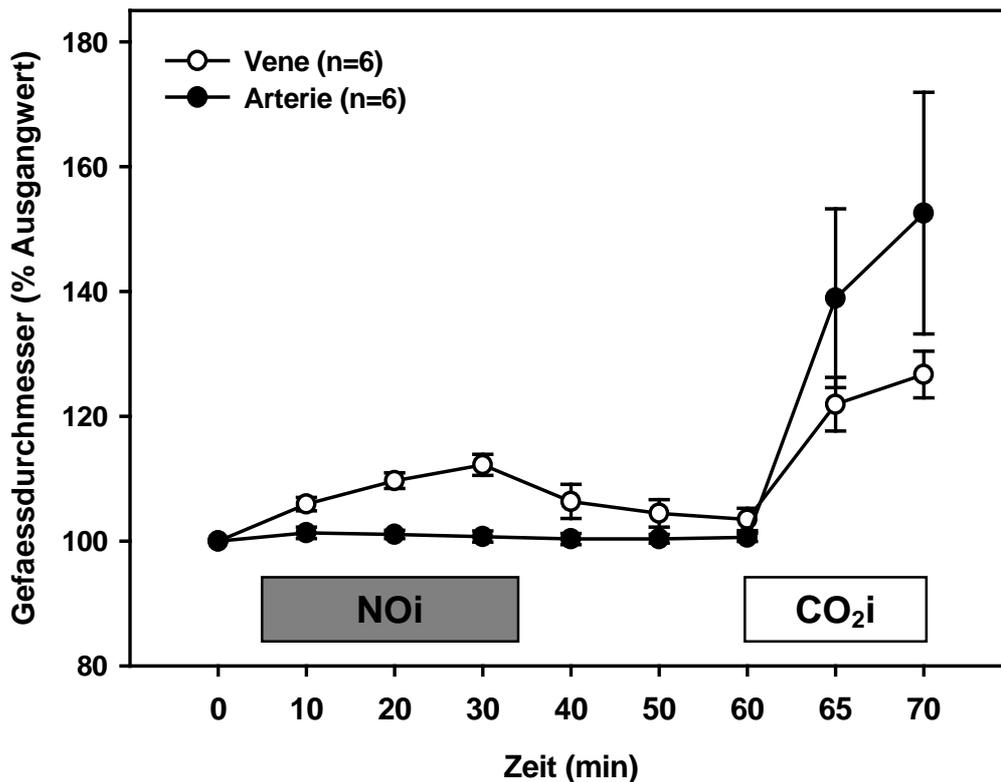
Sowohl die NOi als auch die anschließende CO<sub>2</sub>-Inhalation führten zu keiner signifikanten Veränderung des MAP im Zeitverlauf; über den gesamten Zeitverlauf konnte der MAP über 60 mmHg gehalten werden (Tab. 3-3)

MAP [mmHg]											
Zeit [min]	-20	-10	0	10	20	30	40	50	60	65	70
	87.3±	82.3±	77.5±	75.5±	72.4±	68.0±	70.2±	72.0±	67.8±	75.3±	80.5±
	11.3	11.1	10.1	16.7	10.8	5.7	7.2	5.8	5.7	6.4	10.3

**Tab. 3-3:** Darstellung des MAP [mmHg] in der Versuchsgruppe mit NOi und anschließender CO<sub>2</sub>-Inhalation (n=6). Zum Zeitpunkt 5 Min. beginnt die NOi, zum Zeitpunkt 60 Min. die CO<sub>2</sub>-Inhalation (MW ± SD).

### 3.2.2 Arteriöle und Venöle Gefäßdurchmesser

In jeweils 6 Versuchstieren wurden 19 Arteriolen und 19 Venolen analysiert. Hier zeigte sich wie in der vorangehenden Gruppe, dass die arteriölen Gefäßdurchmesser durch die NOi nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu führte die CO<sub>2</sub>-Inhalation zu einer signifikanten (p<0.01) Zunahme der arteriölen Gefäßdurchmesser um bis zu 70% im Vergleich zum Ausgangswert. Zudem führten sowohl die NOi als auch die CO<sub>2</sub>-Inhalation zu einer signifikanten (p<0.01) Zunahme der venölen Gefäßdurchmesser im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 3-4).



**Abb. 3-4:** Arteriöle und venöle Durchmesser vor, während und nach der Inhalation mit NO (30 Min., 50 ppm) und während anschließender Inhalation mit CO<sub>2</sub> (10 Min., 10 ppm). Die NOi führt zu einer signifikanten Zunahme der venösen Gefäßdurchmesser im Vergleich zum Ausgangswert während die CO<sub>2</sub>-Inhalation zu einer signifikanten Zunahme der arteriölen und venösen Gefäßdurchmesser im Vergleich zum Ausgangswert führt ( $p < 0.01$ , MW  $\pm$  SEM).

### 3.3 NOi während ODQ-Superfusion unter physiologischen Bedingungen

#### 3.3.1 Physiologische Parameter

Sowohl die NOi alleine (Kontrolle), die ODQ-Superfusion als auch die unter ODQ-Superfusion induzierte NOi führten zu keiner signifikanten Veränderung des MAP im Zeitverlauf; über den gesamten Zeitverlauf konnte der MAP über 60 mmHg gehalten werden (Tab. 3-4).

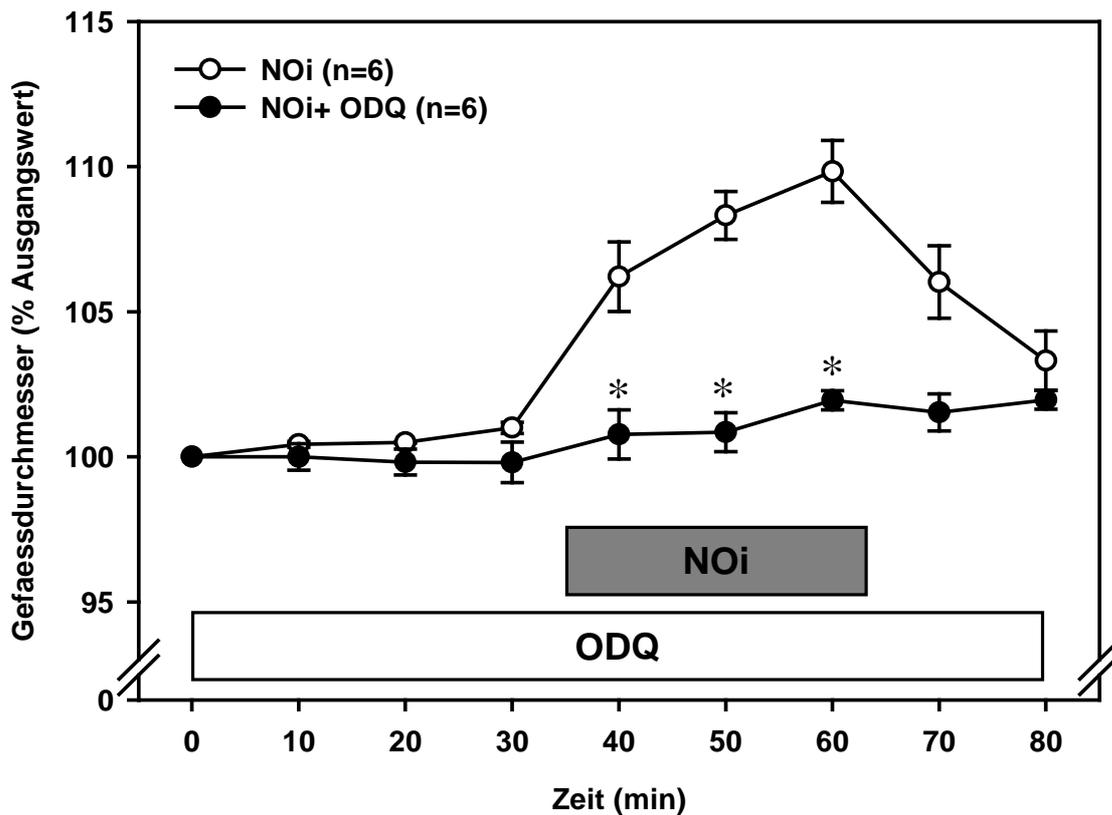
### MAP [mmHg]

Zeit [min]	-20	-10	0	10	20	30	40	50
<b>NOi</b>	79.0± 7.9	77.3± 7.6	73.7± 6.5	70.2± 4.8	68.2± 5.6	68.2± 3.8	68.4± 3.4	69.6± 4.3
<b>NOi + ODQ</b>	76.4± 13.4	74.2± 12.3	72.4± 10.4	70.6± 9.9	69.8± 10.4	68.6± 8.9	63.6± 3.8	63.4± 4.8

**Tab. 3-4:** Darstellung des MAP [mmHg] in der NOi-Gruppe (Kontrolle) und in der Versuchsgruppe mit NOi während ODQ-Superfusion (jeweils n=6). Zum Zeitpunkt 0 Min. beginnt die ODQ-Superfusion und zum Zeitpunkt 35 Min. die NOi (MW ± SD).

### 3.3.2 Venoläre Gefäßdurchmesser

In jeweils 6 Versuchstieren wurden 23 Venolen in der Gruppe mit NOi alleine und 24 Venolen in der Gruppe mit NOi während ODQ-Superfusion analysiert. Hier zeigte sich, dass es mit Induktion der NOi ohne ODQ-Superfusion zu einer im Vergleich mit der Gruppe mit NOi während der ODQ-Superfusion zu einer signifikanten ( $p < 0.05$ ) Zunahme der venolären Gefäßdurchmesser um bis zu 15% kommt. Die Dilatation der Venolen bildet sich mit Beendigung der NOi nur langsam zurück. Die venolären Gefäßdurchmesser bleiben in der Gruppe mit NOi während ODQ-Superfusion über den Beobachtungszeitraum konstant (Abb. 3-5).



**Abb. 3-5:** Venoläre Durchmesser vor, während und nach der Inhalation mit NO (30 Min., 50 ppm) mit und ohne ODQ-Superfusion (80 Min.). Die NOi alleine führt zu einer Zunahme der venolären Durchmesser während der Effekt bei Noi unter Superfusion mit dem Guanylatcyclaseinhibitor ODQ ausbleibt (\* $p < 0.01$ ,  $MW \pm SEM$ ).

### 3.4 NOi unter oligämischen Bedingungen

#### 3.4.1 Physiologische Parameter

Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit NO-Inhalation (NOi, Therapiegruppe) bestand kein Unterschied hinsichtlich des MAP, der in beiden Gruppen einen geringen und nicht signifikanten Abfall im Zeitverlauf zeigte (Tab. 3-5) Bei den Blutgaswerten war der  $pO_2$  in der NOi-Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe ohne statistische Signifikanz zu erreichen, der pH zeigte in beiden Gruppen einen nicht signifikanten Abfall im Zeitverlauf. Ansonsten bestand hinsichtlich pH und Blutgaswerten kein Unterschied zwischen den Gruppen (Tab. 3-6).

### MAP [mmHg]

Zeit [min]	-30	-20	-10	0	10	20	30	40	50
<b>Kontrolle</b>	69± 2.1	67.7± 3.9	66.8± 1.9	65.5± 2.4	65.6± 3.0	65.8± 3.1	64± 1.6	61.6± 1.5	61.8± 1.8
<b>NOi</b>	79.0± 7.9	77.3± 7.6	73.7± 6.5	70.2± 4.8	68.2± 5.6	68.2± 3.8	68.4± 3.4	69.6± 4.3	68.6± 4.3

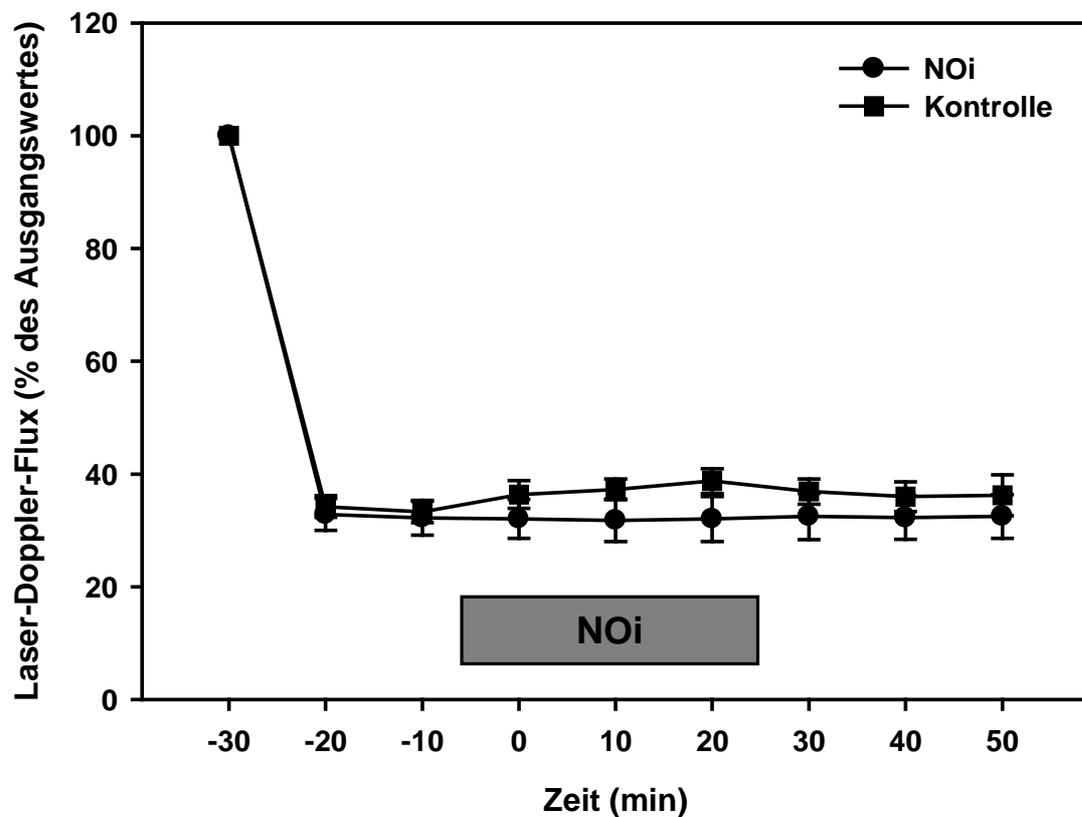
**Tab. 3-5:** Darstellung des MAP [mmHg] in der Kontrollgruppe (n=6) und der NOi-Gruppe (n=6) im Zeitverlauf. (MW ± SD). Zum Zeitpunkt -25 Min. beginnt die Oligämie, Zum Zeitpunkt -5 Min. die NO-Inhalation.

Zeit [min]	pH		pO <sub>2</sub> [mmHg]		pCO <sub>2</sub> [mmHg]	
	-30	50	-30	50	-30	50
<b>Kontrolle</b>	7.37± 0.05	7.27± 0.09	102.10± 21.93	101.45± 30.17	37.93± 3.74	37.23± 5.51
<b>NOi</b>	7.34± 0.03	7.24± 0.03	79.88± 4.61	84.25± 7.24	37.32± 4.99	37.83± 2.99

**Tab. 3-6:** Darstellung des pH, pO<sub>2</sub> [mmHg] und pCO<sub>2</sub> [mmHg] in der Kontrollgruppe (n=7) und der NOi-Gruppe (n=7) zu den Zeitpunkten -30 (vor Beginn der Oligämie und in der NOi-Gruppe auch vor Beginn der Inhalation) und 60 Minuten (nach Beendigung der Oligämie und in der NOi-Gruppe auch nach Beendigung der Inhalation), MW ± SD.

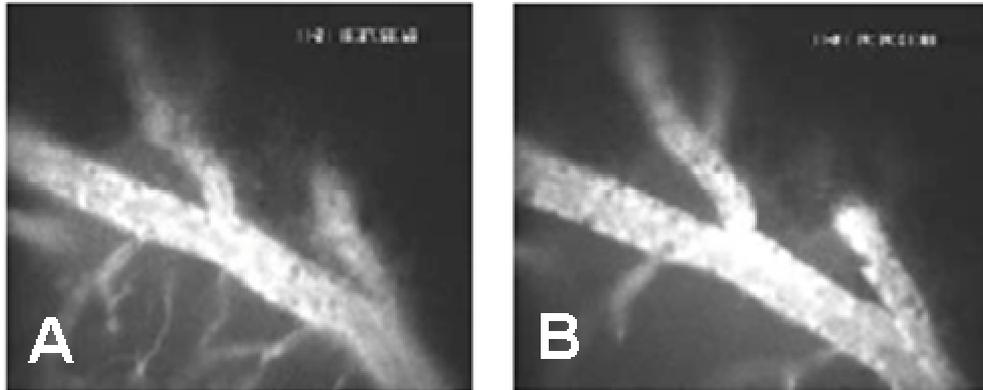
### 3.4.2 Hirndurchblutung

Die Hirndurchblutung in Oligämie wurde mittels transkranial mittels Laser-Doppler Fluxmetrie gemessen. Der Schweregrad der zerebralen Oligämie war in der NOi- und der Kontroll-Gruppe gleich, d.h. 32% bzw. 36% des Ausgangswertes (Abb. 3-6).



**Abb. 3-6:** Vor und während Oligämie wurde die Hirndurchblutung in der NOi- und Kontroll-Gruppe mit Laser-Doppler Fluxmetrie gemessen. Jeder Messzeitpunkt entspricht einem Messintervall von 10 min. Dargestellt ist die Durchblutung in Prozent des Ausgangswertes ( $MW \pm SD$ ). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

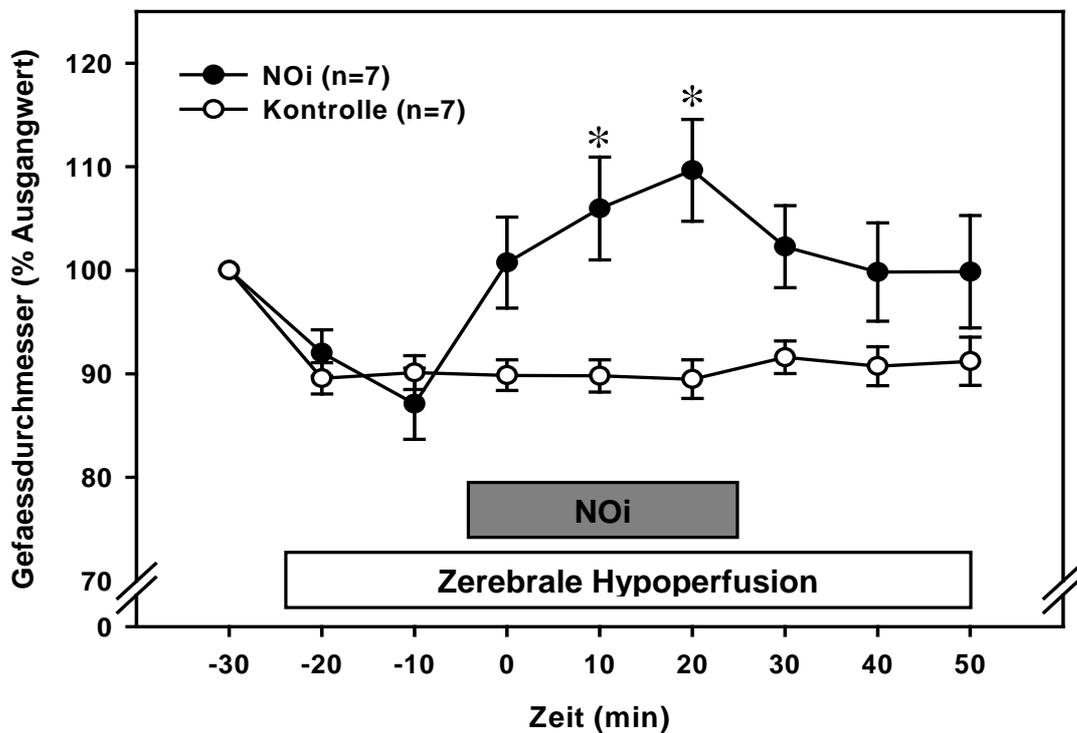
### 3.4.3 Intravitalmikroskopische Beobachtungen



**Abb. 3-7:** Exemplarische Darstellung einer Venole in 25-facher Vergrößerung vor (A) und während (B) NOi unter oligämischen Bedingungen: Die NOi bewirkt eine venoläre Vasodilatation.

### 3.4.4 Arteriöläre Gefäßdurchmesser

In jeweils 7 Versuchstieren wurden 16 Arteriolen in der Kontrollgruppe und 20 Arteriolen in der NOi-Gruppe analysiert. Hier zeigte sich, dass es mit Induktion der NOi zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikanten Zunahme der arteriölären Gefäßdurchmesser kommt, die in ihrer maximalen Ausprägung den Ausgangswert vor Oligämie bis etwa 10 % überschreitet und auch nach Ende der NO-Inhalation bestehen bleibt. Die arteriölären Gefäßdurchmesser nehmen in der Kontrollgruppe nach Induktion der Oligämie um etwa 10% ab. Diese Abnahme der Gefäßdurchmesser nach Induktion der Oligämie ist auch im Vergleich mit den Ausgangswerten statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). (Abb. 3-8).

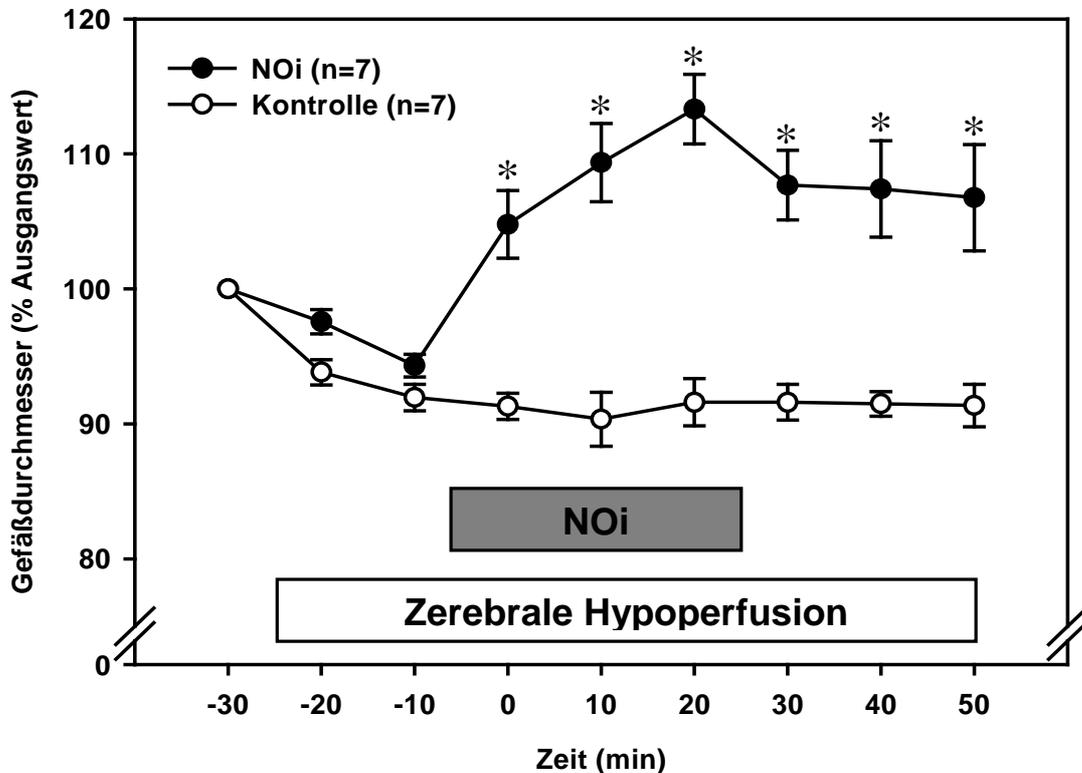


**Abb. 3-8:** Arteriöläre Durchmesser in der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe (NOi, 30 Minuten, 50 ppm) unter Bedingungen einer zerebralen Oligämie. Die arteriölären Durchmesser nehmen während der NOi um bis zu ca. 20% zu, wobei die Vasodilatation auch nach Ende der NOi bestehen bleibt. In der Kontrollgruppe kommt es zu einer Abnahme der Gefäßdurchmesser um etwa 10% (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).

### 3.4.5 Venöläre Gefäßdurchmesser

In jeweils 7 Versuchstieren wurden 25 Venolen in der Kontrollgruppe und 24 Venolen in der NOi-Gruppe analysiert. Hier zeigte sich, dass es mit Induktion der NOi zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikanten Zunahme der venölären Gefäßdurchmesser um bis zu 20% kommt. Die Dilatation der Venolen bildet sich mit Beendigung der NOi nur langsam zurück. Die venölären Gefäßdurchmesser nehmen in der Kontrollgruppe mit Induktion der Oligämie um etwa 10% ab. Diese Abnahme

der Gefäßdurchmesser nach Induktion der Oligämie ist auch im Vergleich mit den Ausgangswerten statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). (Abb. 3-9).



**Abb. 3-9:** Venoläre Durchmesser in der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe (NOi, 30 Minuten, 50 ppm) unter Bedingungen einer zerebralen Oligämie. Die venolären Durchmesser nehmen während der NOi um bis zu ca. 20% zu, wobei die Vasodilatation auch nach Ende der NOi bestehen bleibt. In der Kontrollgruppe kommt es zu einer Abnahme der Gefäßdurchmesser um etwa 10% (\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).

### 3.5 NOi unter Bedingungen einer fokalen zerebralen Ischämie

#### 3.5.1 Physiologische Parameter

MAP, pH and Blugase blieben während des gesamten Beobachtungszeitraumes im physiologischen Bereich. (Tab. 3-7 und Tab. 3-8)

### MAP [mmHg]

Zeit [min]	-20	-10	0	10	20	30	40	50	60
NOi	79.0± 7.9	77.3± 7.6	73.7± 6.5	70.2± 4.8	68.2± 5.6	68.2± 3.8	68.4± 3.4	69.6± 4.3	68.6± 4.3

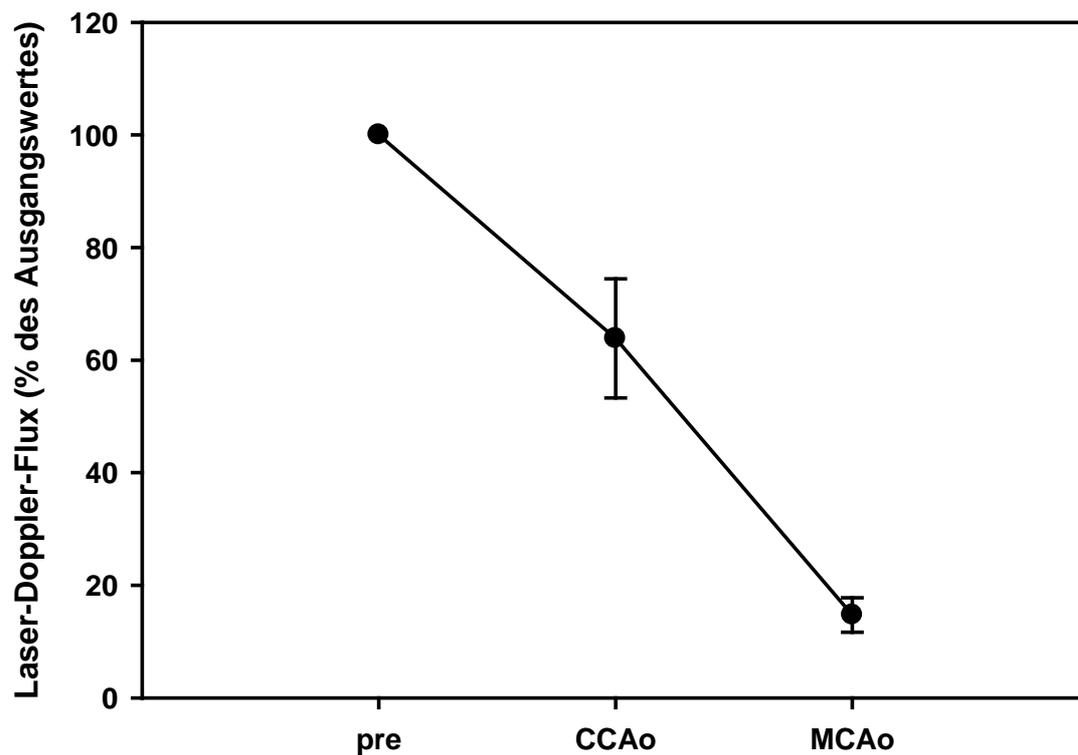
**Tab. 3-7:** Darstellung des MAP [mmHg] in der Kontrollgruppe (n=6) und der NOi-Gruppe (n=6) im Zeitverlauf. (MW ± SD). Zum Zeitpunkt 5 Min. beginnt die NO-Inhalation für 30 Minuten.

	pH		pO <sub>2</sub> [mmHg]		pCO <sub>2</sub> [mmHg]	
Zeit [min]	-20	60	-20	60	-20	60
NOi	7.34± 0.03	7.24± 0.03	79.88± 4.61	84.25± 7.24	37.32± 4.99	37.83± 2.99

**Tab. 3-8:** Darstellung des pH, pO<sub>2</sub> [mmHg] und pCO<sub>2</sub> [mmHg] in der NOi-Gruppe (n=5) zu den Zeitpunkten -20 (vor Beginn der Ischämie und auch vor Beginn der Inhalation) und 60 Minuten (Ende der Versuche, MW ± SD).

### 3.5.2 Lokale Hirndurchblutung

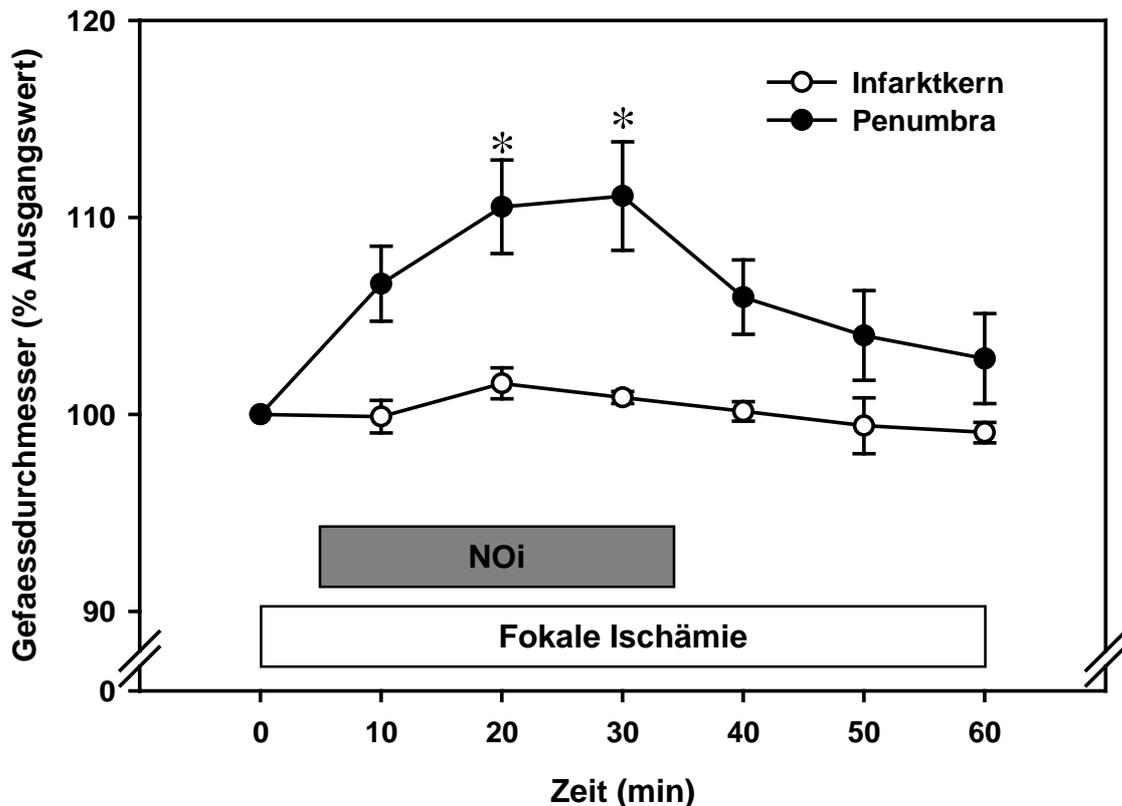
Die lokale Hirndurchblutung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media wurde vor und während Ischämie mittels Laser-Doppler Fluxmetrie gemessen. Die Hirndurchblutung während Ischämie betrug im Mittel 14% des Ausgangswertes (Abb. 3-7)



**Abb. 3-10:** : Hirndurchblutung vor und während fokaler zerebraler Ischämie (Prozent des Ausgangswertes;  $MW \pm SD$ ).

### 3.5.3 Arteriöle Gefäßdurchmesser

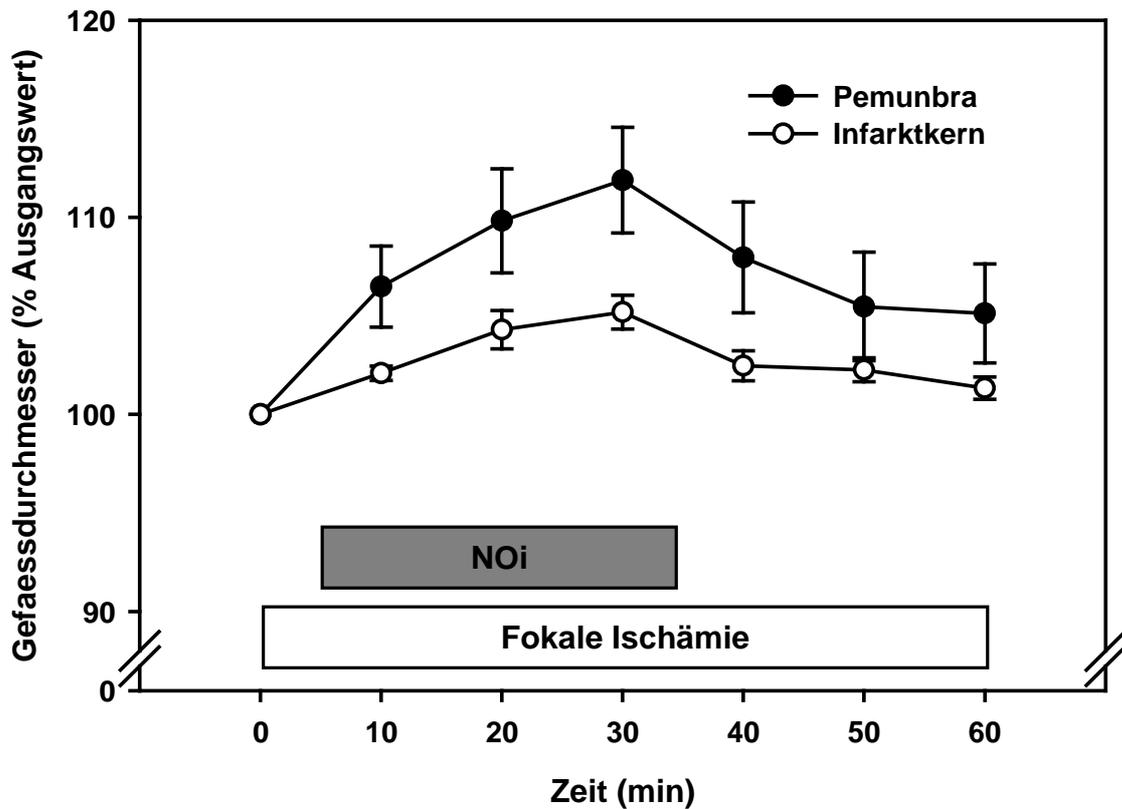
In 5 Versuchstieren wurden 11 arteriölen Gefäßdurchmesser in einer Gruppe mit NOi (50 ppm) unter Bedingungen einer fokalen Ischämie analysiert. Die Analyse des Penumbra-Bereiches ergab im Vergleich mit dem ischämischen Kernbereich, dass es durch die Induktion der NOi in der Penumbra zu einer signifikanten Zunahme der arteriölen Gefäßdurchmesser um bis zu 10% kommt. Im ischämischen Kernbereich bleiben hingegen die Gefäßdurchmesser während des Beobachtungszeitraumes konstant (Abb. 3-10).



**Abb. 3-11:** Arteriöläre Gefäßdurchmesser in der Gruppe mit NOi während fokaler Ischämie in den Bereichen des ischämischen Kerns und der Penumbra. Im Bereich der Penumbra führt die NOi im Vergleich mit dem ischämischen Kern zu einer signifikanten selektiven Vasodilatation um bis zu 20%, die sich nach Beendigung der NOi langsam wieder zurückbildet (\* $p < 0.01$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).

### 3.5.4 Venöläre Gefäßdurchmesser

In 5 Versuchstieren wurden 15 venöläre Gefäßdurchmesser in einer Gruppe mit NOi (50 ppm) unter Bedingungen einer fokalen Ischämie analysiert. Die Analyse des Penumbrabereiches und des ischämischen Kernbereiches zeigte, dass es durch die Induktion der NOi in der Penumbra mehr als im ischämischen Kernbereich zu einer leichten Vasodilatation kommt, die allerdings nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ist und sich nach Beendigung der NOi wieder zurückbildet (Abb. 3-11).



**Abb. 3-12:** Venuläre Gefäßdurchmesser in der Gruppe mit NOi während fokaler Ischämie in den Bereichen des ischämischen Kerns und der Penumbra. In beiden Bereichen führt die NOi zu einer gewissen Vasodilatation, die in der Penumbra etwas akzentuierter aber zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ist, und die sich nach Beendigung der NOi wieder zurückbildet (MW  $\pm$  SEM).

### 3.6 NOi während ODQ-Superfusion unter Bedingungen einer fokalen zerebralen Ischämie

#### 3.6.1 Physiologische Parameter

Zwischen der Gruppe mit NO Inhalation und der Gruppe mit NO-Inhalation und ODQ Superfusion bestand kein Unterschied hinsichtlich des MAP (Tab. 3-5).

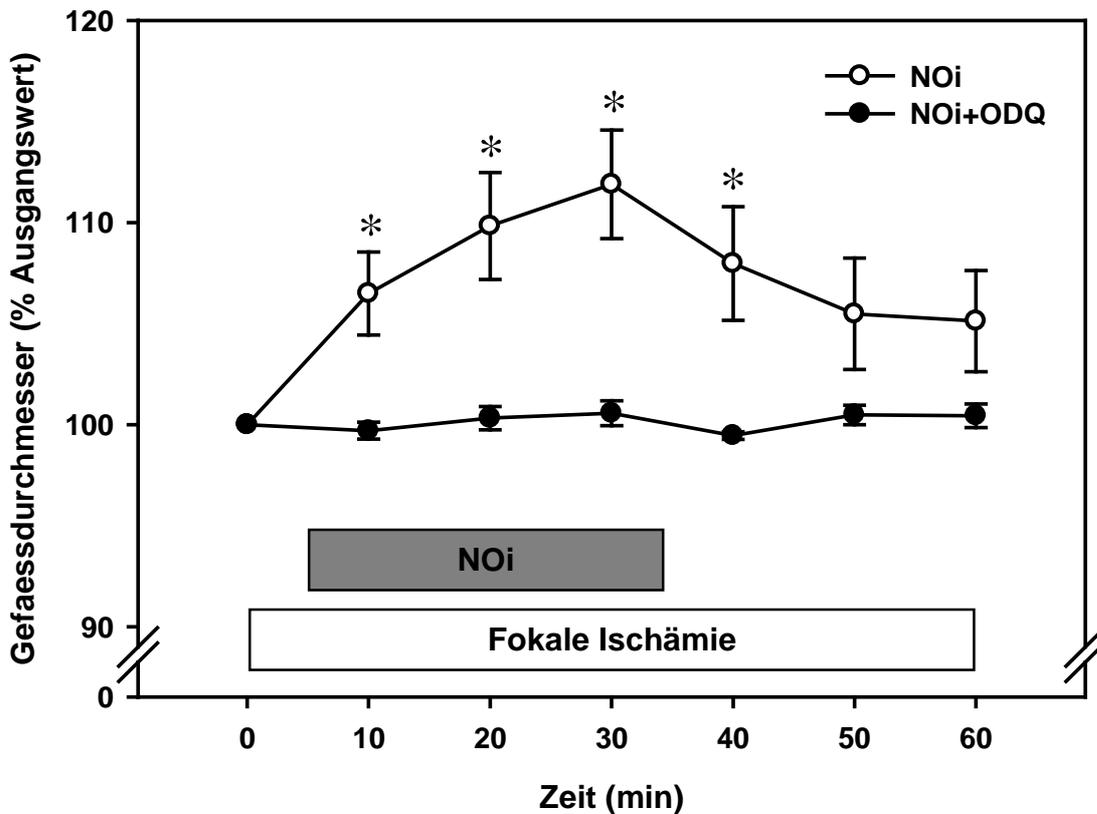
### MAP [mmHg]

Zeit [min]	-20	-10	0	10	20	30	40	50	60
<b>NOi</b>	79.0± 7.9	77.3± 7.6	73.7± 6.5	70.2± 4.8	68.2± 5.6	68.2± 3.8	68.4± 3.4	69.6± 4.3	68.6± 4.3
<b>NOi+ODQ</b>	86.7±2.5	85.0±2.6	87.3±10.4	82.0±8.7	78.3±10.8	78.7±9.3	75.3±10.7	67.7±9.0	67.3±4.2

**Tab. 3-9:** Darstellung des MAP [mmHg] in der NOi-Gruppe (Kontrolle, n=5) und in der Versuchsgruppe mit NOi während ODQ-Superfusion (n=3). Zum Zeitpunkt 0 Min. beginnt die NO-Inhalation (MW ± SD).

#### 3.6.2 Durchmesser zerebraler Venolen

In einer Versuchsgruppe mit Applikation von NO (50 ppm) und ohne Gabe von ODQ (Kontrolle) wurden 15 Venen bei 5 Tieren, in der Gruppe ohne ODQ 5 Venen bei 3 Tieren untersucht. In der Kontrollgruppe zeigte sich zu Beginn der NO Inhalation eine signifikante Zunahme der venolären Gefäßdurchmesser um bis zu 9% ( $p < 0.05$ ). Die Dilatation der Venolen bildet sich mit Beendigung der NOi nur langsam zurück. In der Gruppe mit Gabe von ODQ blieben die venolären Gefäßdurchmesser unverändert (Abb. 3-11). Diese Ergebnisse zeigen, dass inhaliertes NO direkt auf zerebrale Hirngefäße wirkt.

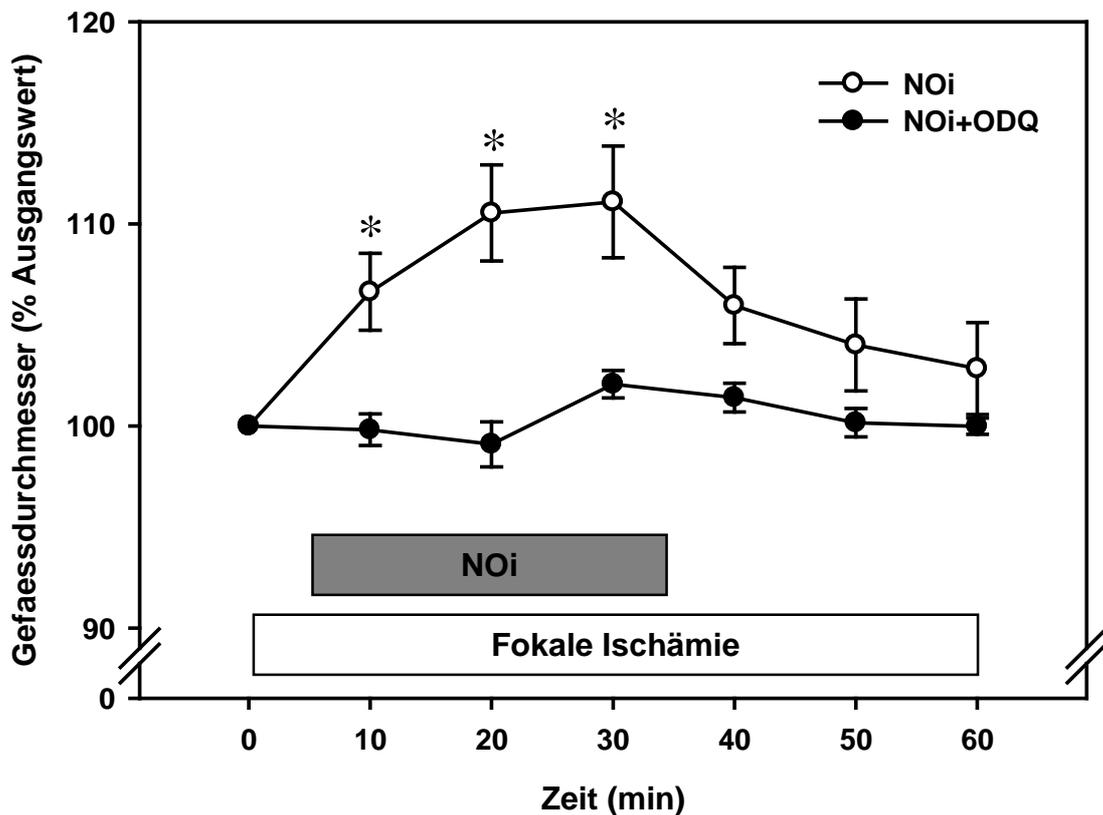


**Abb. 3-13:** Venuläre Durchmesser vor, während und nach der Inhalation von NO (30 Min., 50 ppm) mit und ohne ODQ-Superfusion unter Bedingungen einer fokalen zerebralen Ischämie. Die NOi alleine führt zu einer Zunahme der venulären Durchmesser während der Effekt bei NOi unter Superfusion mit dem Guanylatcyclaseinhibitor ODQ ausblieb (\* $p < 0.05$ , MW  $\pm$  SEM).

### 3.6.3 Arteriolen Gefäßdurchmesser

In einer Versuchsgruppe mit Applikation von NO (50 ppm) und ohne Gabe von ODQ (Kontrolle) wurden 11 Arteriolen bei 5 Tieren, in der Gruppe ohne ODG 4 Arteriolen bei 3 Tieren untersucht. In der Kontrollgruppe zeigte sich zu Beginn der NO Inhalation eine signifikante Zunahme der arteriolen Gefäßdurchmesser um bis zu 9% ( $p < 0.05$ ). Die Dilatation der Arteriolen bildet sich mit Beendigung der NOi nur langsam zurück. In der Gruppe mit Gabe von ODQ blieben die aretriolen

Gefäßdurchmesser weitgehend unverändert (Abb. 3-12). Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch inhaliertes NO hervorgerufene selektive arterioläre Dilatation zerebraler Gefäße unter oligämischen Bedingungen auf eine direkt Wirkung von NO verursacht wird.



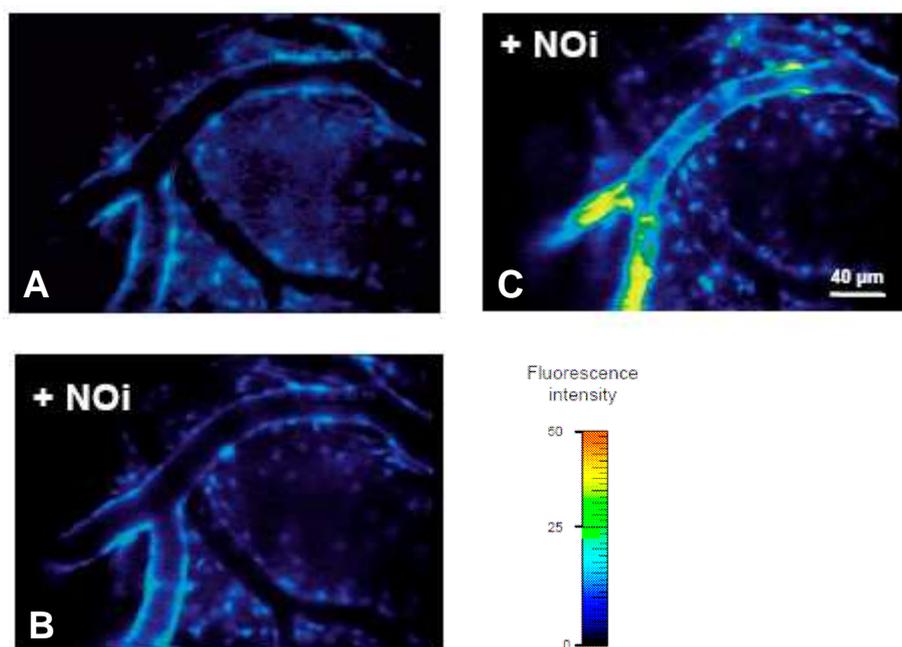
**Abb. 3-14:** Arteriöläre Durchmesser vor, während und nach der Inhalation mit NO (30 Min., 50 ppm) mit und ohne ODQ-Superfusion unter Bedingungen einer fokalen zerebralen Ischämie. Die NOi alleine führt zu einer Zunahme der arteriölären Durchmesser während der Effekt bei Superfusion mit dem Guanylatcyclaseinhibitor ODQ ausblieb (\* $p < 0.05$ ,  $MW \pm SEM$ ).

### 3.7 Vergleich der Expression von DAF mit und ohne NOi unter physiologischen Bedingungen sowie mit NOi unter oligämischen Bedingungen.

#### 3.7.1 Physiologische Parameter

MAP, pH und Blugase blieben während des gesamten Beobachtungszeitraumes im physiologischen Bereich.

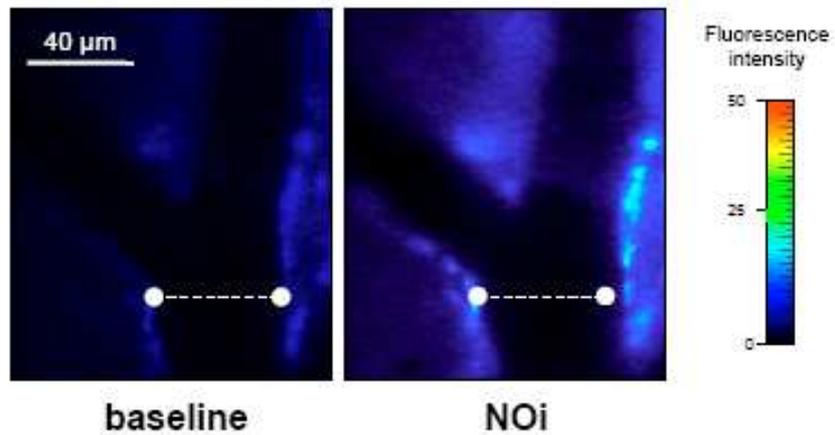
#### 3.7.2 Arteriöläre Expression von DAF



**Abb. 3-15:** Arteriöläre Expression von DAF ohne (A) und mit (B) NOi unter physiologischen Bedingungen sowie mit NOi unter oligämischen Bedingungen (C). In der Gruppe mit NOi unter oligämischen Bedingungen zeigt sich eine deutlich erhöhte DAF-Expression im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen.

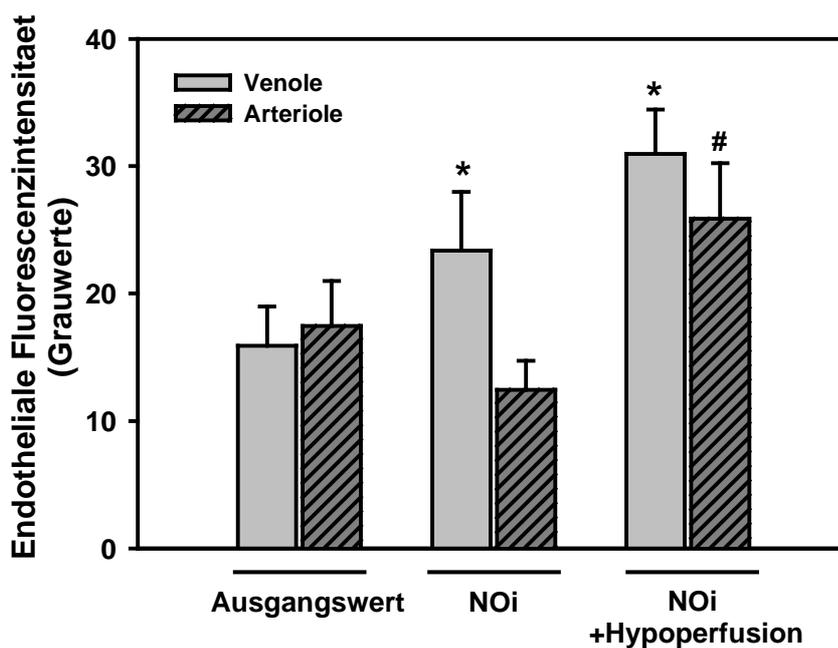
### 3.7.3 Venoläre Expression von DAF

Vor Beginn der NOi war mittels DAF das von den Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen gebildete NO nachweisbar. Bereits 10 Minuten nach Beginn der NOi (50 ppm) kam es zu einer deutlichen Zunahme der DAF-Fluoreszenz (Abb. 3-6).



*Abb. 3-16: Venoläre Expression von DAF vor und während der NO Inhalation.*

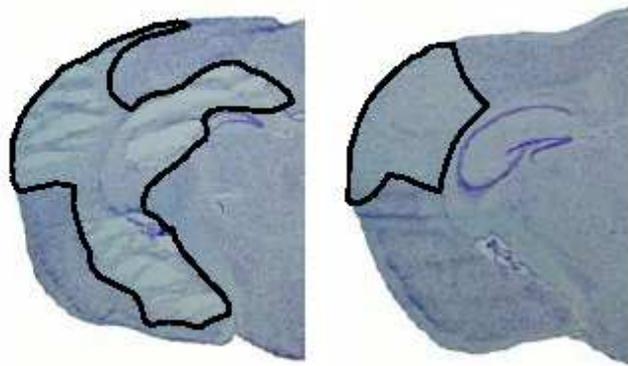
### 3.7.4 Die Quantifizierung der DAF-Fluoreszenz



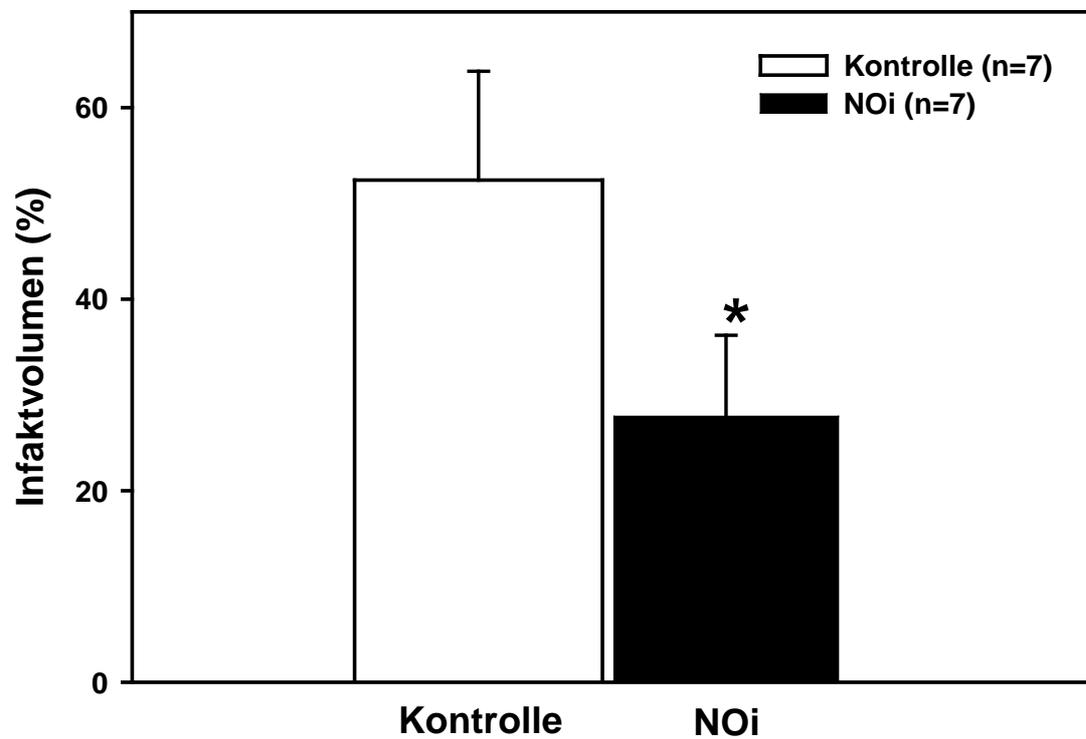
**Abb. 3-17:** Quantifizierung der DAF-Fluoreszenz unter Ausgangsbedingungen, mit NOi unter physiologischen Bedingungen und mit NOi unter oligämischen Bedingungen. Es zeigt sich eine Zunahme der DAF-Fluoreszenz unter NOi in den Venolen und unter NOi während Oligämie auch noch zusätzlich in den Arteriolen (\* $p < 0,01$  vs. Ausgangswert; # $p < 0,01$  vs. NOi unter physiologischen Bedingungen-Arteriolen).

### 3.8 Auswirkungen der NOi auf das Infarktvolumen nach permanenter fokaler Ischämie

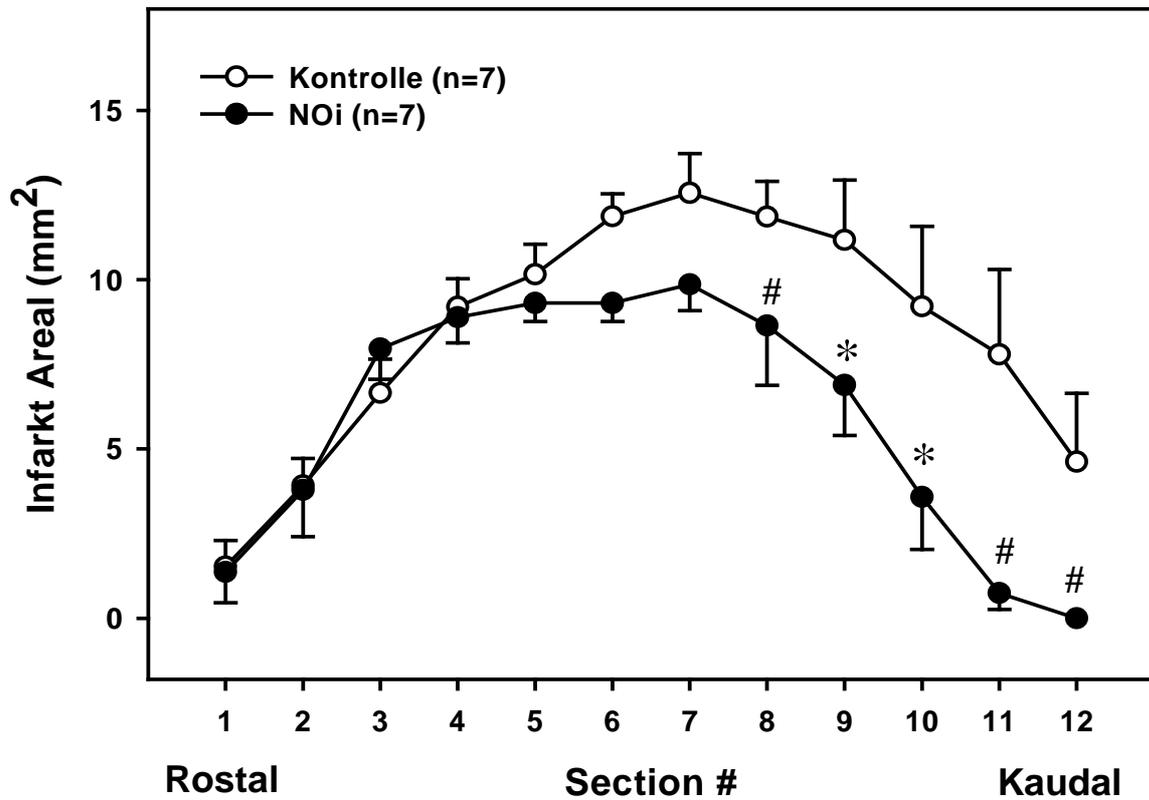
Die NOi führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einer Verringerung des Gesamtfarktolumens um 39% nach 12 Stunden permanenter fokaler Ischämie (Abb 3-14 und 3-15). Der Effekt der NOi auf das Infarktvolumen war in den caudalen Gehirnteilen am stärksten ausgeprägt (Maximum der Penumbra, Abb. 3-16).



**Abb. 3-18:** Exemplarische Darstellung jeweils eines Gehirnschnittes durch das Maximum eines Hirninfarktes nach 12 Stunden permanenter fokaler Ischämie in einem Kontrolltier und einem mit NOi behandelten Tier (12.5-facher Vergrößerung, Nissl-Färbung): Es zeigt sich eine deutliche Neuroprotektion mit geringerer Infarktgröße in dem mit NOi behandelten Tier.



**Abb. 3-19:** Gesamtinfarktvolumen nach 12 Stunden permanenter fokaler Ischämie: Es zeigt sich eine deutliche Infarktreduktion in der mit NOi behandelten Gruppe (\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).



**Abb. 3-20:** Infarktausdehnung nach 12 Stunden permanenter fokaler Ischämie-einzelne Gehirnschnitte durch den Infarkt von rostral nach caudal. Es zeigt sich, dass die NOi die Infarktausdehnung insbesondere in den caudal gelegenen Anteilen beeinflusst (Reduktion der Infarktareale bis zu 20%/ Gehirnschnitt; \* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $MW \pm SEM$ ).

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Diskussion der Methode**

#### **4.1.1 Das experimentelle Modell des Schlaganfalls**

Es gibt unterschiedliche Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls (Waltz, 1979, Megyesi et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde das intraluminale Fadenokklusionsmodell verwendet, die momentan bei Mäusen und Ratten am weitesten verbreitete Technik. Beim Fadenokklusionsmodell wird ein silikonbeschichteter Faden über einen Zugang am Hals intravaskulär nach intrakraniell vorgeschoben bis der Abgang der A. cerebri media verschlossen wird. Die entscheidenden Vorteile dieser Vorgehensweise sind, dass der Schädel nicht eröffnet werden muss, und dass eine transiente als auch eine permanente fokale zerebrale Ischämie induziert werden können. Das Modell simuliert auf funktioneller und morphologischer Ebene und bezüglich der Mortalität einen großen Mediainfarkt mit bzw. ohne Reperfusion, d.h. es entsteht ein großer kortikaler und striataler Infarkt, der zu einer ausgeprägten Halbseitenlähmung führt und nach 7 Tagen eine 80-90%ige Mortalität aufweist.

Dieses Modell ist in unserer Arbeitsgruppe seit 7 Jahren etabliert und ist hochgradig standardisiert und reproduzierbar. Da es keine nennenswerte Alternative zum Fadenokklusionsmodell gibt, haben wir uns auch für die aktuelle Arbeit für dieses operative Prozedere entschieden.

#### **4.1.2 Wahl des Tierstamms**

Zurzeit sind Nagetiere, insbesondere Mäuse, die am häufigsten verwendete Spezies in der Schlaganfallforschung. Dies hat mehrere Gründe: 1) es können genetisch veränderte Stämme verwendet werden, 2) die Tiere können auf Grund ihrer schnellen Reproduktionszeit und ihrer kleinen Größe schnell und kostengünstig gezüchtet werden und 3) Mäuse haben ein robustes Herz-Kreislaufsystem, das die Durchführung von Langzeitnarkosen ermöglicht. Mögliche Nachteile, wie z.B. die auf Grund der Größe der Tiere anzunehmende schwierigere chirurgische Präparation, können durch Verwendung eines Operationsmikroskops, entsprechender mikrochirurgischer Techniken und des Einsatzes von Mikromessonden ausgeglichen werden.

### 4.1.3 Anästhesie

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation war es erforderlich, die Versuchstiere über einen Zeitraum von etwa vier bis sieben Stunden in Narkose zu halten. Mit Hilfe der Atemgasmikrokapnometrie, die den endexpiratorischen CO<sub>2</sub> zuverlässig in Echtzeit misst, konnte eine schonende und den physiologischen Verhältnissen angepasste maschinelle Beatmung der Mäuse gewährleistet werden. Wie bereits publiziert, konnten wir zeigen, dass auch nach längerfristiger Beatmung physiologische Blutgaswerte vorliegen (siehe 4.1.4), Befunde, die in dieser Arbeit bestätigt wurden. Da der pCO<sub>2</sub> einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation des zerebralen Gefäßdurchmessers hat, waren physiologische Blutgaswerte für die aktuelle Arbeit von allergrößter Bedeutung.

Entscheidend für die aktuellen Untersuchungen war auch, dass die verwendeten Narkotika keinen Einfluß auf die zerebrale Durchblutung hatten. Halothan, das in der tierexperimentellen Schlaganfallforschung bisher weite Verwendung fand, beeinflusst die zerebrale Vasoreaktivität, d.h. es wirkt vasodilatativ. König und Mitarbeiter beschrieben, dass die Beatmung mit Halothan beim gesunden Tier zu einer pialen Vasodilatation von 10-20% des Ausgangwertes führte (Koenig et al. 1993). Smith und Mitarbeiter wiesen nach, dass Halothan die regionale zerebrale Durchblutung bei Hunden erhöht: Eine Erhöhung des Halothananteils in der Einatemluft von 0,8% auf 1,5% und 2,1% erhöhte die regionale zerebrale Durchblutung von 100% auf 140% bzw. 200%. Eine längerfristige Halothannarkose kann allerdings auch zu einer Abnahme des regionalen Hirndurchblutung um mehr als 50% führen. (Smith et al. 1973). Dieser Effekt konnte von Boarini und Mitarbeitern bestätigt werden (Boarini et al. 1984). Zudem beobachtete diese Arbeitsgruppe, dass es während mehrstündiger Gabe von Halothan zu einer Erhöhung des zerebralen vaskulären Widerstandes kommt. Ergebnisse von Brussel et al. weisen darauf hin, dass die Autoregulation der zerebralen Durchblutung durch Halothan außer Kraft gesetzt wird und dass die zerebrale Durchblutung unter längerfristiger Halothannarkose druckpassiv ist, also nur vom zerebralen Perfusionsdruck bestimmt wird (Brussel et al. 1991).

Halothan beeinflusst nicht nur die zerebrale Vasoreaktivität, sondern auch die Ausbildung des ischämischen Gewebes Schadens. Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass die Narkose mit Halothan die Infarktgröße nach einer fokalen zerebralen Ischämie verringern kann (Saito et al. 1997, Sarraf et

al. 1999, Warner et al. 1993, Warner et al. 1991). Für diese neuroprotektive Wirkung wurde die Verminderung der endogenen Katecholamfreisetzung durch Halothan verantwortlich gemacht (Hoffman et al. 1993). Auch andere Mechanismen kommen als Ursache der berichteten neuroprotektiven Wirkung in Frage: Halothan scheint die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat zu hemmen (Miao et al. 1995), als Inhibitor am Glutamat-Rezeptor zu wirken (Narimatsu et al., 1996) und die Affinität des GABA Rezeptors zu erhöhen (Harris et al., 1994).

Aus den genannten Gründen haben wir uns für die vorliegende Arbeit gegen eine Inhalationsnarkose mit Halothan entschieden und verwendeten stattdessen eine Kombination der Injektionsanästhetika Medetomidin, Fentanyl und Midazolam. Die intraperitoneale Anwendung dieser Dreifachkombination bei kleinen Nagern ist ein in der Veterinärmedizin weit verbreitetes Verfahren mit guter Steuerbarkeit und einer guten therapeutischen Breite. Entscheidend für diese Arbeit war allerdings, dass dieses Narkoseprotokoll keinen bzw. nur einen vernachlässigbar geringen Einfluß auf die zerebrale Mikrozirkulation hatte.

Wie alle Narkotika haben auch die hier verabreichten Substanzen weitere zerebrale Wirkungen, die die Ergebnisse der aktuellen Untersuchungen möglicherweise beeinflussen könnten. So haben Özden und Mitarbeiter nach Retinaischämie unter Medetomidin, Fentanyl und Midazolam-Narkose eine Zunahme der Zahl überlebenden Ganglienzellen um etwa 40% des Ausgangswertes beobachtet (Özden et al. 2004). Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen weisen zudem darauf hin, dass die Narkose mit Medetomidin und  $\alpha 2$ -Adrenorezeptor-Agonisten die Größe der Nekrose nach fokaler zerebraler Ischämie verringern kann (Jolkkonen et al. 1999, Maier et al. 1993) und dass Midazolam eine geringe neuroprotektive Wirkung hat (Ito et al. 1999). Die dargestellten Nebenwirkungen von Fentanyl, Medetomidin und Midazolam wurden dahingehend bei der Planung der aktuellen Studie berücksichtigt, dass in allen Versuchsreihen Kontrollexperimente durchgeführt wurden, die gewährleisten, dass Narkoseeffekte bei der Auswertung der neuroprotektiven Wirkung von iNO keine Rolle spielten.

#### **4.1.4 Kontrollierte mechanische Beatmung**

In der Literatur herrscht kein klarer Konsens darüber, welche Atemparameter bei Mäusen als physiologisch anzusehen sind. Die unterschiedlichen Angaben sind

wahrscheinlich durch technische Schwierigkeiten bei der Messungen (Enhorning et al. 1998), durch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen (Tankersley et al. 1994) oder durch unterschiedliche Versuchsbedingungen begründet (Dauger et al. 1998).

In verschiedenen Studien erhobene Atemparameter für spontan atmende erwachsene C57BL/6J Mäuse sind im Tabelle 4-1 angegeben.

Atemparameter bei erwachsenen, spontan atmenden C57BL/6J Mäusen					
Autor	KG [g]	RR [ $\text{min}^{-1}$ ]	Vt [ml]	Ti/Tt	Ve [ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ]
Tankersley 1994	23.4	272	0.16	0.29	25.5
Enhorning 1998	(?)	210	(?)	(?)	(?)

**Tab. 4-1:** Physiologische Atemparameter bei spontan atmenden Mäusen. KG: Körpergewicht, RR: respiratory rate (Atemfrequenz), Vt: tidal volume (Atemzugsvolumen), Ti/Tt: inspiratory fraction, Ve: minute volume (Atemminutenvolumen).

In der vorliegenden Studie wurde auf Grund eigener Erfahrungswerte eine Atemfrequenz von  $180\text{-}270/\text{min}^{-1}$  und ein Atemzugsvolumen von  $0,1\text{-}0,2$  ml verwendet. Obwohl die problemlose Anwendung von Beatmungsdrücken über 20 (Brown et al. 1999) oder sogar  $30\text{ cmH}_2\text{O}$  (Lai und Chou. 2000) berichtet wurde, waren in unserer Studie Beatmungsdrücke von  $11\text{-}12\text{ cmH}_2\text{O}$  ausreichend, um eine optimale Beatmung mit regelrechten Atemparametern beizubehalten. Durch dieses niedrige Druckniveau wurde die Gefahr einer Lungenverletzung deutlich verringert (Thal und Plesnila. 2007).

Obwohl die maschinelle Beatmung deutliche Vorteile hat, sind einige Nebenwirkungen bzw. Nachteile zu beachten: 1) die Intubation bei Mäusen ist aufgrund ihrer kleinen Körpergröße technisch anspruchsvoller als z. B. bei Ratten, 2)

Eine maschinelle Beatmung führt im Vergleich zur normalen Atmung zu einem deutlich höheren intrapulmonalen Druck und hemmt so den venösen Rückstrom zum Herzen.

Um Beatmungsschäden zu vermeiden und eine möglichst physiologische Situation bei der maschinellen Ventilation zu gewährleisten, haben wir die Beatmung unserer Versuchstiere mittels Mikrokapnometrie optimiert.

#### **4.1.5 Kapnometrie**

Das geringe Blutvolumen von Mäusen (~ 1,8 ml) lässt regelmäßige Blutgasanalysen nicht zu ohne den Makro- und Mikrohämatokrit und das Blutvolumen zu beeinträchtigen. Um den  $p\text{CO}_2$  ohne regelmäßige Blutentnahme zu messen, kann die nicht invasive Methode der Mikrokapnometrie verwendet werden. Dabei wird der endexpiratorische  $\text{CO}_2$ -Partialdruck ( $P_{\text{ETCO}_2}$ ) gemessen, der im hohen Maße mit dem Kohlenstoffdioxid-Partialdruck im arteriellen Blut,  $P_{\text{artCO}_2}$  korreliert. Bisher gibt es keinen klaren Konsens, welcher Kohlenstoffdioxid-Partialdruck im arteriellen Blut von Mäusen normalerweise vorherrscht (Arras et al. 2001, Dalkara et al. 1995, Ohuchi et al. 1999, Thal und Plesnila. 2007). Tabelle 4-2 gibt eine Übersicht über die in der Literatur festgestellten Werte. Als Referenzwerte übernommen wird die Ergebnisse der Studie von Thal und Plesnila, da die Versuchsbedingungen in der vorliegenden Studie den beschriebenen Versuchen sehr ähnlich waren.

Obwohl die Werte des  $P_{\text{ETCO}_2}$  gut mit dem durch die arterielle Blutgasanalyse festgestellten  $P_{\text{artCO}_2}$  korrelieren (Thal und Plesnila. 2007) hat das Verfahren der Kapnometrie bekannte Limitationen. Der  $P_{\text{ETCO}_2}$  ist systematisch niedriger als der  $P_{\text{artCO}_2}$ , da sich der  $P_{\text{ETCO}_2}$  aus den  $p\text{CO}_2$  Werten perfundierter als auch nicht perfundierter Alveolen zusammensetzt. Insofern kann nur dann ein zuverlässiger Zusammenhang zwischen  $P_{\text{artCO}_2}$  und  $P_{\text{ETCO}_2}$  hergestellt werden, wenn der Anteil perfundierter Alveolen über den Versuchszeitraum konstant bleibt. Trotz dieser Limitation und eher theoretischen Überlegungen, dass sich der alveoläre  $\text{PCO}_2$  während des Atemzyklus ändert und sich daraus ein Unterschied zwischen  $P_{\text{ETCO}_2}$  und  $P_{\text{alvCO}_2}$  ergeben könnte (Benallal und Busso. 2000), ist die Kapnometrie dennoch die einzige nicht-invasive Messmethode mit der die Ventilation von Mäusen zuverlässig in Echtzeit gemessen und dadurch reguliert werden kann.

Blutdruck und Blutgase von Mäusen						
Autor	Stamm	$P_{art}CO_2$ (mmHg)	$P_{art}O_2$ (mmHg)	pH	MABP (mmHg)	HR ( $min^{-1}$ )
Arras et al., 2001	NMRI	$25 \pm 0,8$	$100 \pm 2,5$	$7,44 \pm 0,01$	$89 \pm 0,6$	$534 \pm 13$
Dalkara et al., 1995	SV-129	$31 \pm 2,0$	$148 \pm 41$	$7,31 \pm 0,05$	$86 \pm 9,0$	$545 \pm 78$
Ohuchi et al., 1999	SV-129	$27,6 \pm 1,2$	$85,9 \pm 1,6$	$7,34 \pm 0,01$	$110 \pm 4,0$	$664 \pm 21$
Thal & Plesnila, 2007	C57Bl6	$36 \pm 4,8$	$133 \pm 46$	$7,35 \pm 0,04$	-	$168 \pm 22$

**Tab. 4-2:** Physiologische Parameter adulter Mäuse.  $P_{art}CO_2$ : arterieller  $CO_2$ -Partialdruck,  $P_{art}O_2$ : arterieller Sauerstoffpartialdruck, ; MABP: mittlerer arterieller Blutdruck; HR: Pulsfrequenz.

#### 4.1.6 Laser Doppler Fluxmetrie

Der Goldstandard für die Quantifizierung der Hirndurchblutung ist die  $^{14}C$ -Jodoantipyrin Autoradiographie. Dabei wird radioaktiv markiertes Jodoantipyrin, ein Marker, der sich in Abhängigkeit von der Durchblutung im Gewebe anreichert, intravenös appliziert und nach Tötung im Gehirn und Blut gemessen. Dadurch kann die zerebrale Durchblutung zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme mit hoher räumlicher Auflösung absolut, d.h. in 100 ml/100 g Gewebe/min, bestimmt werden. Diese Methode erfordert jedoch die Tötung des Versuchstieres und ist somit für eine Verlaufsbeobachtung ungeeignet. Ähnliches gilt für die Durchblutungsmessung mit radioaktiv oder fluoreszierend markierten Mikrosphären, die ein vergleichbares Messverfahren verwenden.

Im Gegensatz dazu misst die Laser-Doppler Fluxmetrie Veränderungen der Gewebedurchblutung mit Hilfe des Doppler-Effekts, d.h. über eine Frequenzänderung von Laserlicht der Wellenlänge 820 nm durch an der Messsonde vorbeiziehende Erythrozyten. Der Laser-Doppler Flow wird aus dem Produkt der Konzentration der Erythrozyten im gemessenen Gewebeareal und der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten errechnet (Frerichs et al. 1990). Die Messung der Hirndurchblutung mittels Laser-Doppler Fluxmetrie liefert im Vergleich zu Messungen mit radioaktiven Mikrosphären, Autoradiographie oder Clearance-

Methoden keine absoluten Werte, sondern zeigt relative Änderungen in einem kleinen Gewebevolumen von ca.  $1\text{mm}^3$  (Dirnagl et al. 1989, Fukuda et al. 1995). Der Vorteil der Laser-Doppler Fluxmetrie liegt in der kontinuierlichen Aufzeichnung von Durchblutungsänderungen und in der hohen zeitlichen Auflösung (1Hz), die eine rasche Beurteilung des Durchblutungsabfalls nach Induktion der Ischämie und der Erholung im weiteren Verlauf ermöglicht. Außerdem ist die LDF nichtinvasiv und kann problemlos über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt werden. Nachteile der LDF sind einerseits ihre geringe Eindringtiefe von nur ca. 1,5 mm sowie die Anfälligkeit der Methode für Bewegungsartefakte; diese können jedoch durch Fixierung der Sonde am Schädel der Maus vollständig vermieden werden. Deswegen erschien unter Abwägung aller Vor- und Nachteile die Laser-Doppler Fluxmetrie die für uns angemessenste Methode zur Quantifizierung der zerebralen Durchblutung.

#### **4.1.7 Intravitalmikroskopie**

Für diese Studie wurde erstmalig ein verbesserte und modernisierte Versuchsaufbau zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation bei der Maus verwendet. In den meisten der bisher veröffentlichten Studien wurde ein geschlossenes kranielles Fenster bei Ratten verwendet (Kawamura et al. 1990, Dirnagl et al. 1994). Diese Technik erfordert die Eröffnung der Dura mater und die Superfusion der Gehirnoberfläche mit künstlichem Liquor. Das Modell ist invasiv und technisch sehr anspruchsvoll; die Präparation des Fensters gelingt auf grund nur schwer vermeidbarer Mikroblutungen in weniger als 50% der Fälle. Die Messung ist auch anfällig für Artefakte und die Beobachtungszeit ist auf eine Stunde beschränkt. Im Vergleich dazu ist die transdurale Fenstertechnik, die in unserer Arbeitsgruppe bereits bei Gerbils in einem Modell der globalen zerebralen Ischämie etabliert wurde (Uhl et al. 2000), technisch einfach und kaum invasiv, d.h. die Dura mater und der Subarachnoidalraum bleiben intakt, so dass die pialen Gefäße in ihrem physiologischen Umfeld beobachtet werden können. Diese Ergebnisse wurden von Ishikawa und Kollegen (Ishikawa et al. 2003) sowie durch eine andere Studie aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt (Kataoka et al. 2004).

In der selben Studie wurde gezeigt, dass die transdurale Technik zu keiner Aktivierung der Leukozyten-Endothelinteraktion führt, d.h. die Kraniotomie, die

Superfusion der harten Hirnhaut mit physiologischer Kochsalzlösung und die wiederholte Belichtung des Gehirns nicht zur Aktivierung einer inflammatorischen Antwort führt und die Gehirnoberfläche nicht verletzt.

Es bleibt jedoch zu bedenken, dass mit der intravitalmikroskopischen Methode nur oberflächliche piale Gefäße beobachtet werden können. Folglich besteht die Möglichkeit, dass Veränderungen, die in diesen Gefäßen beobachtet werden möglicherweise nicht repräsentativ für die Gefäße im übrigen Gehirn sind. Dies gilt insbesondere für die Situation nach Okklusion der A. cerebri media: in tiefen Gehirnbereichen, z.B. im Striatum, wo der „Kern“ des Infarktes lokalisiert ist, herrschen komplett andere Durchblutungsverhältnisse als in pialen Gefäßen, die die Penumbra versorgen. Für die aktuelle Studie spielt dieser Unterschied allerdings keine Rolle, da das Hauptinteresse tatsächlich auf der Durchblutung der Penumbra lag.

#### **4.1.8 Untersuchung der Mikrozirkulation**

Die zerebrale Mikrozirkulation wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer direkten Untersuchungsmethode, der Intravitalmikroskopie, beobachtet. Der Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes erlaubte die quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser, der Leukozyten-Endothelinteraktionen, der funktionellen Kapillardichte sowie die semiquantitative Analyse der lokalen mikrovaskulären Durchblutung und die qualitative Bestimmung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke. Die Beobachtungen wurden zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten vorgenommen, um die Dynamik der Veränderungen nach NO-Inhalation beschreiben zu können. Nur mit dieser Methode kann eine solch hohe zeitliche Auflösung ohne Gewebeverletzung erreicht werden. Nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung können die Tiere wieder aus der Narkose erwachen. Dadurch kann der postischämische Nervenzellschaden quantifiziert werden.

Die Beobachtung der Hirnoberfläche auf mikroskopischer Ebene ist prinzipiell im Durch- oder Auflichtverfahren möglich. Pawlik und Mitarbeiter stellten 1981 eine Untersuchung kortikaler Kapillaren und Yamakawa und Mitarbeiter 1987 eine Untersuchung zum Verhalten weißer Blutzellen während hämorrhagischer Hypotension bei Katzen in Transilluminationstechnik vor (Pawlik et al. 1981,

Yamakawa et al. 1987). Die Verwendung eines intrakortikalen Mikrotransilluminators verursachte jedoch eine traumatische Gewebeerstörung, eine Öffnung der BHS, Ödemformation, Mikroblutungen und eine vermehrte Wärmeproduktion. Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Epiillumination-Mikroskopie treten diese Probleme nicht auf.

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

Um phototoxische Effekte und das Ausbleichen der Farbstoffe zu minimieren, wurden die Belichtungszeiten auf 40 Sekunden pro Messgebiet und Messzeitpunkt reduziert. Die hochempfindliche SIT-Restlichtkamera in Verbindung mit einem 25x Salzwasser-immersionsobjektiv erlaubte es auf eine hohe Anregungslichtintensität zu verzichten. Eine Störung der Blut-Hirnschranke, die als sensitiver Marker photochemischer Schädigung gilt (Miller et al. 1992), wurde nicht beobachtet.

#### **4.1.9 ODQ**

ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-eins), eine erst in den vergangenen Jahren entwickelte Substanz, hemmt spezifisch die lösliche Guanylat-Cyclase, sGC (Garthwaite et al. 1995, Moro et al. 1996). Neuere Untersuchungen von Feelisch und Mitarbeiter ergaben zwar auch Hinweise auf unspezifische Wirkungen (Feelisch et al. 1999), dennoch bleibt ODQ die derzeit spezifischste Substanz zur Hemmung der sGC (Hobbs. 1997).

#### **4.1.10 DAF**

Mehrere Meßmethoden zum Nachweis von Stickstoffmonoxid sind in der Literatur beschrieben: Spektrophotometrie, Elektronen-Resonanz-Spektroskopie (EPR),

Voltametrie und Fluorometrie (Palmer et al. 1987, Komarov et al. 1993, Shibuki et al. 1990, Misko et al. 1993). Es wurde allerdings gezeigt, dass die meisten dieser Methoden aufgrund des hohen Diffusionsvermögens, der Reaktivität, der Instabilität und vor allem der niedrigen Konzentration von NO im Gewebe nur eine sehr begrenzte Empfindlichkeit aufweisen und deswegen nur für die Messung von hohen NO-Konzentrationen in Lösungen geeignet sind. Zur Visualisierung und genauen Lokalisierung von NO in lebenden Zellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorofluorescein (DAF-FM) entwickelt (Nagano et al. 2002). In der vorliegenden Studie wurde DAF-FM erstmals *in vivo* eingesetzt. DAF-FM wurde direkt unter die Dura mater, d.h. in den Subarachnoidalraum, appliziert und reichte sich überraschenderweise in zerebrovaskulären Endothelzellen der dort gelegenen Gefäße an. Somit konnte mit DAF die basale NO-Produktion bestimmt und über die Zeit gemessen werden. Da die Inhalation von NO das DAF Signal deutlich erhöhte, kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ein für NO spezifisches Signal gemessen wurde.

#### **4.1.11 Histologie**

Zur Beurteilung des postischämischen Hirnschadens wurde die Zahl nekrotischer Neurone in seriellen Nissl gefärbten koronaren Hirnschnitten verblindet mit dem Lichtmikroskop quantifiziert. Durch etablierte Protokolle für Fixation, Entnahme und Einbettung des Gehirns sowie Schneiden und Färben des histologischen Präparats konnten Artefakte und sich daraus ergebende falsche Schlussfolgerungen zuverlässig vermieden werden.

Wie erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit die Gehirne wie von Brown und Brierley erstmals beschrieben perfusionsfixiert (Brown und Brierley. 1968). Diese Methode verbessert die Qualität histologischer Präparate wesentlich und wurde in unserem Labor durch Verwendung einer 4% Paraformaldehydlösung und Verlängerung der Perfusion auf mindestens 20 min bei konstantem Druck optimiert (Eriskat. 2000). Dadurch konnten Fixationsartefakte ausgeschlossen und die Verwechslung von artifiziell geschrumpften mit durch Ischämie geschädigten Nervenzellen (Eke et al. 1990) zuverlässig vermieden werden.

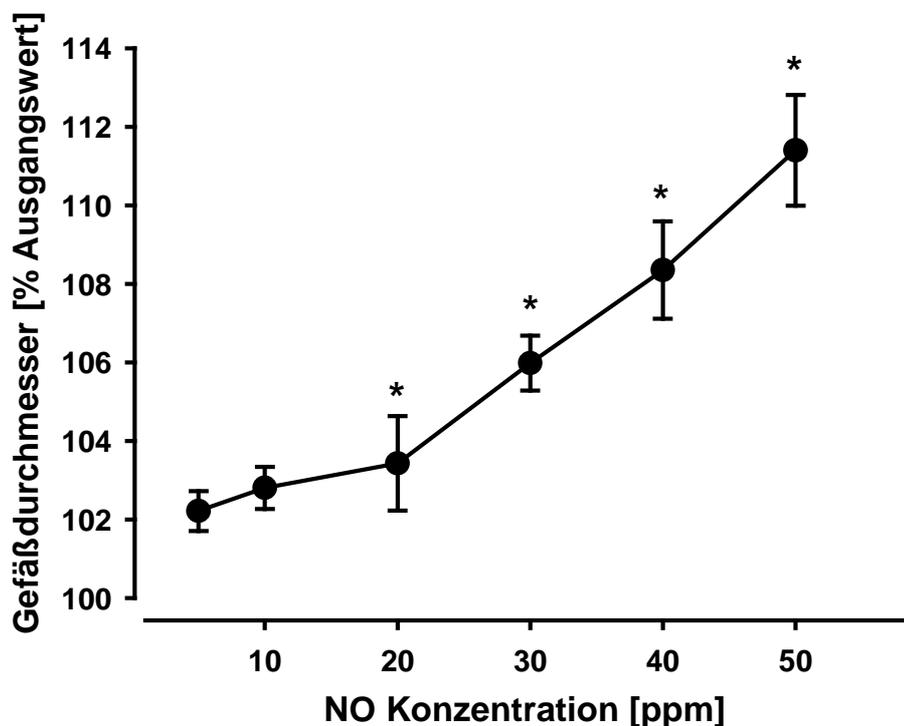
In den vorliegenden Experimenten wurde die Färbung mit Kresylviolett nach Nissl zur Beurteilung von Nervenzellen verwendet (Nissl et al. 1926). Crain und Mitarbeiter

konnten zeigen, dass bei der Analyse histologischer Hirnschnitte ähnliche Ergebnisse erzielt wurden, unabhängig davon ob die Präparate mit Kresylviolett (Nissl-Färbung), Hematoxylin/Eosin (HE-Färbung) oder Hematoxylin/Eosin/Luxol Fast Blue gefärbt wurden (Crain et al. 1988).

#### 4.1.12 Dosierung von NO

Die aktuell für Erwachsene empfohlenen NO-Konzentrationen für den pulmonalen Einsatz liegen bei einer Einstiegsdosis von 20 bis maximal 40 ppm.<sup>109</sup> Bei Neugeborenen sind auch sehr niedrige Dosen von 2-5 ppm nachweislich wirksam. Im Tierversuch werden NO-Konzentrationen von 2 bis 300 ppm verwendet. Bei der Wahl der Dosis orientierten wir uns an den zu Beginn der Studie gültigen Empfehlungen für Erwachsene von maximal 50 ppm.

In einer Vorstudie zeigte sich in unserem Mausmodell in der Intravitalmikroskopie bei Dosen von 10 bis 50 ppm eine deutliche Dosisabhängigkeit des NO - Effekts, wobei die stärkste Vasodilatation bei einer Dosierung von 50 ppm auftrat (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1:** Die NO-Wirkung auf zerebrale Gefäße ist dosisabhängig.

Auch unter dieser moderaten Dosierung sind jedoch NO-Nebenwirkungen, besonders im Langzeit-Versuch, nicht ausgeschlossen. Stickstoffmonoxid ist in Raumluft instabil und kann Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) bilden, das toxisch ist und an der Entstehung vieler umweltverschmutzungsbedingter kardiovaskulärer und pulmonaler Erkrankungen beteiligt ist (Belanger et al. 2006, Chauhan et al. 1998, Katsouyanni. 2003). Eine geringfügige Entstehung von NO<sub>2</sub> ist bei dem von uns verwendeten Versuchsaufbau nicht gänzlich auszuschließen (Weinberger et al. 2001). Bei Langzeit - Beatmung wurde deswegen neben der NO- auch die Stickstoffdioxid - Konzentration laufend gemessen. Sie war zu allen Zeitpunkten unter 1 ppm und somit unter dem empfohlenen Grenzwert von 2 ppm (Germann et al. 2005).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 NO-Inhalation unter physiologischen Bedingungen

Wir konnten zeigen, dass es unter physiologischen Bedingungen während NO-Inhalation zu einer signifikanten venösen Vasodilatation, aber zu keiner Veränderung des Durchmessers von Arteriolen kommt. Somit konnte erstmalig ein iNO-Effekt auf zerebrale Gefäße bzw. allgemein auf extrapulmonale Gefäße, nachgewiesen werden. Bisher gab es zwar deutliche Hinweise darauf, dass eingeatmetes Stickstoffmonoxid extrapulmonale Wirkungen hat (siehe Tab. 4-3), ein direkter Effekt konnte bisher aber nie gezeigt werden.

Zentrales Nervensystem		
Autor	Effekte der NO-Inhalation	Spezies
Moenkhoff 1998	Reversible EEG Veränderungen	Mensch
Kuebler 2003	Anstieg des zerebralen Blutvolumens	Schwein
Mestan 2005	↑ Neuronales Wachstum bei Frühgeburten	Mensch

Herz		
Autor	Effekte der NO-Inhalation	Spezies
Barrington 2000	Verminderte linksventrikuläre Dysfunktion während Sepsis	Schwein
Hataishi 2004	↓ Senkung von Infarktvolumen und linksventrikulärer Dysfunktion nach Ischämie/Reperfusionsschaden	Maus
Gianetti 2004	↓ Senkung der Myokardschädigung während kardiopulmonaler Bypass-OP	Mensch

Niere und Darm		
Autor	Effekte der NO-Inhalation	Spezies
Troncy 1997	↑ Renaler Blutfluss, kein Effekt auf renalen Clearance	Schwein
Fox-Robichaud 1999	↓ Leukozyten Adhesion in Mikrozirkulation während Sepsis und Ischämie-Reperfusion	Katze

Übrige Organe oder Systeme		
Autor	Effekte der NO-Inhalation	Spezies
Cannon 2001	Steigerung der peripheren Durchblutung	Mensch
Kielbasa 2001	Senkung des hepatischen Nitrotyrosins	Ratte
Beghetti 2003	Hemmung der Thrombozyten-Aggregation	Mensch
Gries 2003	Verminderte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion bei ARDS	Mensch

**Tab. 4-3:** Extrapulmonale Wirkungen von inhaliertem Stickstoffmonoxid in verschiedenen Organsystemen

Besonders die Ergebnisse von Fox-Robichaud und Cannon zeigen, dass inhaliertes NO eine Wirkung auf lungenferne Gefäße haben kann: Fox-Robichaud und

Mitarbeiter wiesen nach, dass inhaliertes NO distale Mikrogefäße erreichen, dort die Reaktion des Endothels auf oxidative und antioxidative Stimuli verändern kann und so die Leukozytenadhäsion inhibieren kann (Fox-Robichaud et al. 1998). Cannon und Mitarbeiter konnten zeigen, dass iNO die normale Gefäßweite erhalten kann, wenn die endogene NO-Produktion gehemmt wird; ohne iNO führt die NOS-Blockade zur Vasokonstriktion (Cannon et al. 2001). Wie genau bioaktives NO in die Peripherie transportiert und dort freigesetzt wird, ist bislang unklar. In der Literatur werden hauptsächlich zwei Wirkungsmechanismen diskutiert: Weitertransport und Freisetzung von NO durch Hämoglobin und Umwandlung von NO zu Nitrit in der Lunge, das dann peripher wiederum zu NO reduziert wird.

Zunächst dachte man, dass NO von Hämoglobin sofort zu Nitrat umgewandelt und somit inaktiviert wird (Dou et al. 2002, Doyle et al. 1981, Herold et al. 2003). Es scheint jedoch möglich, dass NO an Hämoglobin bindet, unter Bildung von S-nitroso-Hämoglobin (S-NO-Hb; Jia et al. 1996). Diese Bindung erfolgt bevorzugt, wenn sich das Hämoglobin-Molekül im oxygenierten Zustand (oxyHb) befindet, da dann, im oxygenierten oder R (relaxed) Zustand, der Cystein-Rest, an den das NO bindet, exponiert wird (Jia et al. 1996). Beim Übergang in den desoxygenierten Zustand wird die Abgabe des NOs erleichtert; NO wird demnach also bevorzugt in Regionen mit niedrigem  $pO_2$  wieder freigesetzt (Bonaventura et al. 1999, Gladwin et al. 2000, Gow et al. 1998, Jia et al. 1996, Stamler et al. 1997). Die S-NO-Hb-Konzentration im Blut war jedoch in einigen Studien auch unter NO-Inhalation sehr gering (unter 10 nM) (Rassaf et al. 2003, Schechter et al. 2002), weswegen einige Untersucher anzweifeln, dass dies der Mediator der peripheren iNO-Wirkung ist.

Nitrit ( $NO_2^-$ ) entsteht aus der Reaktion von NO mit Sauerstoff ( $O_2$ ) und reagiert anders als reines NO nur sehr langsam mit Hb. Außerdem ist es im Plasma stabiler als Nitrosothiole wie S – NO – Hb (Gladwin et al. 2002). Die Angaben der  $NO_2^-$  -Konzentration im menschlichen Plasma schwanken zwar stark (150 – 31.000 nM) (Gladwin et al. 2000, Macarthur et al. 2007, Rassaf et al. 2003), scheinen aber höher zu sein als S-NO-Hb. Auch für Nitrit gibt es mehrere sauerstoffpartialdruckabhängige Freisetzungswege: einerseits kann Desoxy-Hb Nitrit zu NO reduzieren (Gladwin et al. 2004). Die NO - Freisetzung würde durch diese Reaktion bei niedrigem  $pO_2$  begünstigt. Darüberhinaus gibt es auch andere enzymatische und nichtenzymatische Reaktionswege zur NO-Freisetzung aus Nitrit; hierbei erfolgt jedoch auch die NO-

Freisetzung bevorzugt bei niedrigem  $pO_2$  (Doel et al. 2000, Godber et al. 2000, Schechter et al. 2002).

Neben den beiden Reaktionswegen werden noch einige weitere Mechanismen diskutiert (Rassaf et al. 2002, Stamler et al. 1992), die ebenfalls bevorzugt unter hypoxämischen Bedingungen ablaufen. Zusammenfassend kann man sagen, dass der genaue Wirkmechanismus der peripheren NO-Inhalations-Wirkung nicht abschließend aufgeklärt ist, aber die NO-Freisetzung offensichtlich bevorzugt bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck erfolgt.

Plesnila und Mitarbeiter konnten zeigen, dass im zerebralen Mikrogefäßbett die Hämoglobin-Entsättigung auf Kapillaren und Venolen beschränkt ist (Plesnila et al. 2002). Die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen NO-Effekte erfolgen also tatsächlich dort wo niedrige Sauerstoffpartialdrücke vorliegen, d.h. in zerebralen Venolen.

#### **4.2.2 Inhaliertes NO und CO<sub>2</sub>**

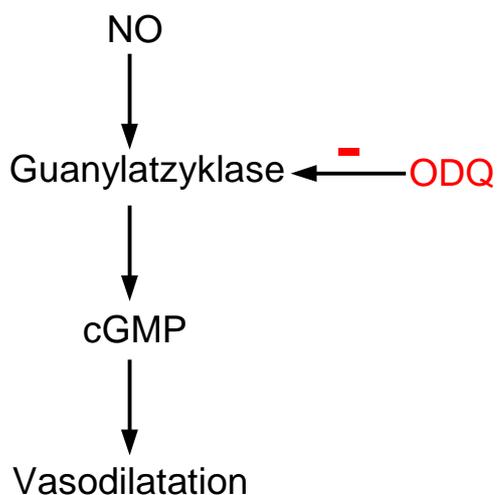
Es stellt sich natürlich die Frage, warum normal durchbluteten Gehirnarterien auf die Gabe von NO nicht reagieren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Gefäße durch die chirurgische Präparation mechanisch alteriert wurden und dadurch zum Zeitpunkt der NO Inhalation bereits maximal dilatiert waren. Um diesem möglichen Einwand zu begegnen, wurde die Versuchsserie mit gleichem Aufbau wiederholt und die Tiere zur Überprüfung der arteriolären Dilatationsfähigkeit am Ende des Versuchs mit 10% CO<sub>2</sub> beatmet, einem starken Dilatator zerebraler Gefäße (Reivich et al. 1964, Korein et al. 1966). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung des arteriellen  $pCO_2$  eine maximale Dilatation zerebraler Arterien bewirkt. Die Ursache für die fehlende Reaktion auf NO beruht deshalb nicht auf einer Vasoparalyse oder einer bereits vorliegenden maximalen Dilatation, sondern wahrscheinlich tatsächlich auf einer unter physiologischen Bedingungen selektiven Freisetzung von NO in zerebralen Venolen.

#### **4.2.3 Inhaliertes NO mit ODQ**

In der vorliegenden Untersuchung konnte intravitalmikroskopisch beobachtet werden, dass die topische Anwendung des spezifischen Guanylat-Cyclase-Inhibitors ODQ zur

Hemmung der venodilatierenden iNO-Wirkung auf zerebrale Gefäße führt. Wie in Abb. 4-1 gezeigt, ist der einzige bekannte Weg über den NO eine Vasodilatation vermitteln kann, die Aktivierung der Guanylatzyklase und hierdurch die Bildung von zyklischem Guanosin-Mono-Phosphat (cGMP). Durch Hemmung der Guanylatzyklase kann die NO-Wirkung prinzipiell nicht mehr vermittelt werden; die unter iNO beobachtete Vasodilatation der zerebralen Venolen läßt sich nach Anwendung von ODQ nicht mehr nachweisen. Da ODQ - wie oben erwähnt - ein hochspezifischer Inhibitor der Guanylat-Cyclase ist, kann davon ausgegangen werden, dass NO tatsächlich für die beobachtete Vasodilatation verantwortlich ist.

Diese Versuche zeigen eindeutig, dass die Wirkung von inhaliertem NO auf zerebrale Gefäße nicht über einen unbekanntem indirekten pulmonalen Effekt, sondern direkt an zerebralen Gefäßen von NO selbst vermittelt wird, d.h. NO wird von der Lunge in das Gehirn transportiert und hat dort eine selektive Wirkung auf venöse Gefäße.



**Abb. 4-2:** Die Guanylatzyklase(sGC) ist der Mediator der NO-vermittelten Signalübertragung. Durch die Umwandlung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) reguliert die sGC die Aktivierung der Vasodilatation. ODQ führt zu einer spezifischen Hemmung der sGC, somit wird die Vermittlung der NO-Wirkung blockiert.

#### 4.2.4 Inhaliertes NO mit DAF-FM

Die Ergebnisse der ODQ-Versuche zeigten deutlich, dass das eingeatmete NO die beobachtete Vasodilatation vermittelt haben muß. Im nächsten Schritt wollten wir daher NO direkt im Gehirn bzw. in zerebralen Gefäßen nachweisen. Dafür wurde der Farbstoff DAF -FM verwendet. DAF zeigt in seiner Grundform keine Fluoreszenz. Erst wenn es mit NO reagiert, zeigt sich unter Anregung mit Licht der Wellenlänge

488 nm eine grüne Fluoreszenz bei 520 nm. Die Anwendung von DAF zur NO-Darstellung in endothelialen Zellen wurde mehrfach beschrieben (Nakatsubo et al. 1998, Qi et al. 2004, Rathel et al. 2003, Goetz et al. 1999, Leikert et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurde diese Methode erstmalig zum Nachweis von NO in vivo angewendet. Unsere Daten zeigen, dass DAF-FM verwendet werden kann, um in vivo Zellen, die NO enthalten, spezifisch zu kennzeichnen und um Änderungen der NO Konzentration unter physiologische sowie pathophysiologische Bedingungen zu beobachten.

### **4.3 Pathophysiologische Bedingungen**

#### **4.3.1 Inhaliertes NO unter Oligämie**

Wie bereits erwähnt führte die Inhalation von NO unter physiologischen Bedingungen zu einer rein venösen Vasodilatation. Da alle Mechanismen der NO-Freisetzung sauerstoffpartialdruckabhängig zu sein scheinen, erschien es möglich, dass auch die unter iNO beobachteten zerebralen Effekte eine  $pO_2$ -abhängige Kinetik zeigen könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Versuche unter Oligämie durchgeführt. Hierbei zeigte sich unter inhaliertem NO zusätzlich zur bereits beobachteten Venen- auch eine Arterien-dilatation. Diese Beobachtung kann durch die Verschiebung der NO Freisetzung von rein venösen auf arterielle und venöse Gefäßabschnitte erklärt werden. Unter physiologischen Bedingungen ist der  $pO_2$  auf der arteriellen Seite bekanntlich hoch, während er auf der venösen Seite im Vergleich dazu niedriger ist. Wir konnten zeigen, dass NO im arteriellen Blut transportiert und auf der venösen Seite freigesetzt wird. Der zugrundeliegende Mechanismus für dieses Phänomen ist ein Bohr-ähnlicher Effekt, aufgrund dessen NO bei niedrigen  $pO_2$ - oder pH-Werten freigesetzt wird. Unter physiologischen Bedingungen ist der  $pO_2$  nur auf der venösen Seite erniedrigt, so dass NO wahrscheinlich nur hier freigesetzt wird und eine Dilatation bewirkt. Unter oligämischen Bedingungen- mit unphysiologisch niedrigem Sauerstoffpartialdruck in allen Gefäßabschnitten findet die Hämoglobinentsättigung teilweise bereits im arteriellen Stromgebiet statt (Tsai et al. 2002). Die iNO-verursachte Gefäßdilatation kommt unter diesen Bedingungen bereits an den Arteriolen zum Tragen; da eine arterielle Vasodilatation zu einer Erhöhung der Durchblutung führt, kann mit der NO-Inhalation selektiv die Durchblutung in minderperfundierten, hypoxämischen

Gebieten erhöhen. Da dadurch Blut von anderen, normal perfundierten Arealen abgezogen wird, nannte Cannon diesen Effekt „Robin Hood Effekt“ (Take from the rich, give to the poor: Cannon. 1989) oder umgekehrtes Steal-Phänomen (im Gegensatz zu klassischen Steal-Phänomen bei dem Blut aus minderperfundierten Arealen zugunsten besser durchbluteter Gebiete umgeleitet wird).

#### **4.3.2 Inhaliertes NO nach fokaler zerebraler Ischämie**

Wie unter Oligämie zeigte sich auch nach fokaler zerebraler Ischämie eine signifikante Vasodilatation sowohl von Venolen als auch von Arteriolen. Wir konnten nachweisen, dass inhaliertes NO in einem Schlaganfallmodell selektiv die Durchblutung minderperfundierter Hirnareale verbessert. Dies zeigt sich längerfristig in einem verbesserten Überleben der Neuronen in der Penumbra, also einem kleineren Infarktvolumen. Dieser Effekt war auf minderperfundierte Bereich begrenzt, d.h. die normal durchbluteten Hirnareale wurden durch die NO-Inhalation nicht beeinflusst. Auch im Infarktkern, wo die Durchblutung zum Stillstand gekommen ist und wohin demnach auch kein NO transportiert werden kann, bleibt die zerebrale Durchblutung unbeeinträchtigt. Außerdem ist – wie vorher ausgeführt – die Durchblutung der Core-Region eines Infarkts so schnell so stark beeinträchtigt, dass der Zelltod fast sofort eintritt; dass es hier auch durch geringfügige Reperfusion zu keiner Neuroprotektion kommt, ist demnach nicht überraschend. In der Penumbra führt die NO-Inhalation allerdings zu einer signifikanten Verbesserung der Durchblutung um etwa 40%. Laut dem Hagen-Poiseuille-Gesetz müsste es durch die in der vorliegenden Studie beobachteten arteriolen Vasodilatation von 10% zu einer Zunahme der Penumbra-Durchblutung um 46% kommen-ein Wert, der mit dem gemessenen Wert von 40% sehr gut übereinstimmt.

#### **4.3.3 Histologie**

Unter NO-Inhalation zeigte sich eine Reduktion des ischämischen Hirnschadens um ca. 40%. Die protektive Wirkung der NO-Inhalation ließ sich auch nachweisen, wenn iNO während der frühen Reperfusion angewendet wurde; es besteht also ein gewisses Zeitfenster für die Anwendung der Therapie. In Übereinstimmung mit der regionalen Zunahme der Durchblutung verringerte iNO den neuronalen Zelltod überwiegend in der Penumbra. Das therapeutische Konzept der iNO-Anwendung

nach Schlaganfall erfordert, dass weite Teile der Penumbra noch nicht nekrotisch sind und somit durch Reperfusion gerettet werden können. Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass ein Beginn der NO Inhalation zwei Stunden nach Beginn der Ischämie keine neuroprotektive Wirkung mehr hatte. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die belegen, dass eine Reperfusion im Modell der fokalen zerebralen Ischämie nur dann das Infarktvolumen verringern kann, wenn sie innerhalb von 2 Stunden nach Ischämie eingeleitet wird (Mao et al. 2000). Mao und Mitarbeiter beobachteten, dass eine rechtzeitige Reperfusion im Vergleich zu einem permanenten Gefäßverschluß das Infarktvolumen um 70% verringern kann. Somit hat die NO-Inhalation ein ähnliches therapeutisches Fenster wie die Reperfusion.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die pulmonale Applikation von NO auch eine Wirkung auf zerebrale Gefäß entfaltet. Für diese Untersuchungen wurde ein experimentelles Modell zur Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie bei der Maus etabliert. Die Ergebnisse zeigten, dass im normal perfundierten Gehirn inhaliertes NO (iNO) zu einer selektiven venösen Vasodilatation führt und diese Wirkung durch eine zerebrale Wirkung von NO vermittelt wird. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist ein Transport von NO mit dem Blutstrom aus der Lunge in das Gehirn, der NO in Gefäßabschnitte mit niedrigem  $pO_2$  freisetzt. Basierend auf diesen Untersuchungen entstand die Hypothese, dass im ischämischen Gehirn, in dem bereits auf der arteriolären Seite der Endstrombahn niedrige  $pO_2$  herrschen, NO auch in diesem Gefäßabschnitt freigesetzt werden müsste und somit zu einer Erhöhung der Durchblutung führen müsste. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde das Modell der zerebralen Intravitalmikroskopie mit einem Modell der zerebralen Oligämie und einem Schlaganfallmodell kombiniert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass inhaliertes NO unter ischämischen Bedingungen, wie angenommen, auch arterioläre Gefäße dilatiert, die zerebrale Durchblutung in der ischämischen Penumbra verbessert und dadurch zu einer deutlichen Verringerung des post-ischämischen Hirnschadens beiträgt.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können deswegen folgende Schlüsse gezogen werden: Unsere Experimente zeigen die Wirksamkeit der NO-Inhalation als Therapie der zerebralen Ischämie. Nachdem die NO-Inhalation in der Klinik zugelassen ist und bisher keine Nebenwirkungen bekannt sind, muss über ihre klinische Anwendung beim Schlaganfall nachgedacht werden. Somit konnte mit der vorliegenden Arbeit ein gänzlich neues Therapieprinzip für fokale Ischämien entwickelt werden, das möglicherweise auch ausserhalb des Gehirns wirkungsvoll sein könnte.

## 6 ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG

In this work should be reviewed, whether the pulmonary application of Nitric Oxide also have unfolded an effect on cerebral vessel. For these studies, an experimental model for observation of cerebral microcirculation through intravital microscopy in mice was established. The results showed that inhaled NO (iNO) induced in normal perfused brain to a selective venous vasodilatation, and this effect mediated through a cerebral effect of NO. The answerable mechanism of it is a transport of NO with the blood stream from the lungs into the brain, which NO in vessel section with low  $pO_2$  releases. Based on these studies, the hypothesis was that NO in this vessel section should be released in the ischemic brain, which already prevailed low  $pO_2$  on the arteriolar side of the terminal vessel, and should lead an increase in blood flow. To this hypothesis experimentally to prove, the model of cerebral intravital microscopy with a model of cerebral oligemia and stroke was combined. The results of these studies showed that inhaled NO in ischemic condition, as adopted, also dilatated arteriolar vessels, thus improved the cerebral blood flow in ischemic penumbra and thus improved to a considerable reduction in post-ischemic brain damage.

The results of this work can thus be concluded that: Our experiments show the effectiveness of the NO inhalation as a treatment of cerebral ischemia. Since the NO inhalation in the clinic is approved, and so far no side effects are known, must have their clinical application of stroke has to be considered. Thus, the present work is a completely new treatment for focal Ischemia be developed, and could be effective even outside the brain.

## 7 LITERATUR

1. AKIMITSU, T., GUTE, D. C., und KORTHUIS, R. J. (1995). Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 78, 1725-1732.
2. ALBERT, J., NORMAN, M., WALLEN, N. H., FROSTELL, C. und HJEMDAHL, P. (1999). Inhaled nitric oxide does not influence bleeding time or platelet function in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Invest* 29, 953-959.
3. AMERICAN HEART ASSOCIATION. (2001). 2002 Heart and Stroke Statistical Update. American Heart Assotiation.
4. ARNOLD, W. P., MITTAL, C. K., KATSUKI, S. und MURAD, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 3203-3207.
5. ARRAS, M., AUTENRIED, P., RETTICH, A., SPAENI, D., RULICKE, T. (2001). Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 51, 443–56.
6. ASTRUP, J., SIESJO, B. K. und SYMON, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725.
7. ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N. M. und LASSEN, N. A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51-57.
8. ATOCHIN, D. N., DEMCHENKO, I. T., ASTERN, J., BOSO, A. E., PIANTADOSI, C. A. und HUANG, P. L. (2003). Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 1219-1226.
9. BARON, J.C. (1999). Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 9, 193–201.
10. BARRINGTON, K.J., ETCHES, P.C., SCHULZ, R., TALBOT, J.A., GRAHAM, A.J., PEARSON, R.J., CHEUNG, P.Y. (2000). The hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and endogenous nitric oxide synthesis blockade in newborn piglets during infusion of heat-killed group B streptococci. *Crit Care Med* 28, 800–808.
11. BEGHETTI, M., SPARLING, C., COX, P.N., STEPHENS, D., ADATIA, I. (2003). Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physio* 285, H637–H642.

12. BELANGER, K., GENT, J. F., TRICHE, E. W., BRACKEN, M. B. und LEADERER, B. P. (2006). Association of indoor nitrogen dioxide exposure with respiratory symptoms in children with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 173, 297-303.
13. BENALLAL, H., BUSSO, T. (2000). Analysis of end-tidal and arterial pCO<sub>2</sub> gradients using a sibreathing model. *Eur J Appl Physiol.* 83. 402–8.
14. BOARINI, D. J., KASSELL, N. F., COESTER, H. C., BUTLER, M., und SOKOLL, M. D. (1984). Comparison of systemic and cerebrovascular effects of isoflurane and halothane. *Neurosurgery* 15, 400-409.
15. BONAVENTURA, C., FERUZZI, G., TESH, S. und STEVENS, R. D. (1999). Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin. *J.Biol.Chem.* 274[35], 24742-24748.
16. British Heart Foundation. *Coronary Heart Disease Statistics.* (2002).
17. 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. *Br J Exp Pathol* 49(2), 87-106.
18. BROWN, R.H., WALTERS, D. M., GREENBERG, R. S., MITZNER, W. A. (1999). method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J Appl Physiol* 87, 2362–5.
19. BRUSSEL, T., FITCH, W., CRODNER, G., ARENDT, I. und VAN, A. H. (1991). Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in th baboon. *Anesth. Analg.* 73, 758-764.
20. CANNON, R.O. (1989). AmiNOphylline for angina: the “Robin Hood” effect? *J Am Coll Cardiol* 14(6), 1454-1455.
21. CANNON, R.O. III, SCHECHTER, A.N., PANZA, J.A., OGNIBENE, F.P., PEASE-FYE, M.E., WACLAWIW, M.A., SHELHAMER, J.H., GLADWIN, M.T. (2001). Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest* 108. 279–287.
22. CHAUHAN, A. J., KRISHNA, M. T., FREW, A. J. und HOLGATE, S. T. (1998). Exposure to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and respiratory disease risk. *Rev.Environ.Health* 13[1-2], 73-90.
23. CHEUNG, P. Y., PELLOWSKI, A. und ROBERTSON, C. M. (1998). The outcome of very low birth weight neonates (<=1500 g) rescued by inhaled nitric oxide: neurodevelopment in early childhood. *J. Pediatr.* 133, 735-739.

24. 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.
25. DALKARA, T., IRIKURA, K., HUANG, Z., PANAHIAN, N., MOSKOWITZ, M.A. (1995). Cerebrovascular responses under controlled and monitored physiological conditions in the anesthetized mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, 631–8.
26. DAUGER, S. NSEGBE, E. VARDON, G.. GAULTIER ,C. und CALLEGO, G. (1998). The effect of restraint on ventilatory response to hypercapnia and hypoxia in adult mice. *Respir Physiol.* 112(2):215-225.
27. DIRNAGL, U., KAPLAN, B. und JACEWICZ, M. (1989). Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flow metry in a rat stroke model. *J Cereb. Blood Flow Metab* 9,589-596.
28. DIRNAGL, U., NIWA, K., SIXT, G: und VILLRINGER, A. (1994). Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke.* 25(5), 1028-38.
29. DOEL, J. J., GODBER, B. L., GOULT, T. A., EISENTHAL, R. und HARRISON, R. (2000). Reduction of organic nitrites to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidase: possible role in metabolism of nitrovasodilators. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 270[3], 880-885.
30. DOPPENBERG, E. M., CHOI, S. C., und BULLOCK, R. (2004). Clinical trials in traumatic brain injury: lessons for the future. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 16, 87-94.
31. DOU, Y., MAILLETT, D. H., EICH, R. F. und OLSON, J. S. (2002). Myoglobin as a model system for designing hemeprotein based blood substitutes. *Biophys. Chem.* 98, 127-148.
32. DOYLE, M. P. und HOEKSTRA, J. W. (1981). Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J.Inorg. Biochem.* 14, 351-358.
33. EKE, A., CONGER, K. A., ANDERSON, M., GARCIA, J.H. (1990). Histologic assessment of neurons in rat models of cerebral ischemia. *Stroke* 21(2), 299-304.
34. EKEKEZIE, I. I., THIBEAULT, D. W., ZWICK, D. L., REZAIKHALIGH, M. H., MABRY, S. M., MORGAN, R. E., NORBERG, M. und TRUOG, W. E. (2000). Independent and combined effects of prolonged inhaled nitric oxide and oxygen on lung inflammation in newborn piglets. *Biol. Neonate* 77, 37-44.

35. ENHORNING, G., VAN SCHAİK, S., LUNDGREN, C., und VARGAS, I. (1998). Whole body plethysmography, does it measure tidal volumes of small animals? *Can J Physiol Pharmacol* 76,945-951.
36. ERISKAT, J. (2000). Wachstumskinetik der Parenchymnekrose des Gehirns nach fokalem Trauma. Ludwig-Maximilians-Universität.
37. EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. (2006). Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: the Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 27, 1341-1381.
38. FEELISCH, M., KOTSONIS, P., SIEBE, J., CLEMENT, B. und SCHMIDT, H.H. (1999). The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxodiazolo-[4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol.* 56, 243-253.
39. FLECKNELL, P. A. (1993). Anaesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesth* 71, 885-894.
40. FOX-ROBICHAUD, A., PAYNE, D., KUBES, P. (1999). Inhaled NO reaches distal vasculatures to inhibit endothelium- but not leukocyte-dependent cell adhesion. *Am J Physiol* 277. L1224–L1231.
41. FOX-ROBICHAUD, A., PAYNE, D., HASAN, S. U., OSTROVSKY, L., FAIRHEAD, T., REINHARDT, P. und KUBES, P. (1998). Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J.Clin.Invest* 101[11], 2497-2505.
42. FRATACCI, M.D., FROSTELL, C. G., CHEN, T. Y., WAIN, J. C. Jr., ROBINSON, D. R. und ZAPOL, W. M. (1991). Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* 75, 990-999.
43. FRERICHS, K.U., FEUERSTEIN, G. Z. (1990). Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol Chem Neuropathol.* 12(1),55-70.
44. FROSTELL, C., FRATACCI, M. D., WAIN, J. C., JONES, R. und ZAPOL, W. M. (1991). Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83, 2038-2047.
45. FUKATSU, K., SAITO, H., HAN, I., FURUKAWA, S., LIN, M. T., MATSUDA, T., IKEDA. S., INOUE, T., YASUHARA, H., und MUTO, T. (1998). Nitric oxide donor

- decreases neutrophil adhesion in both lung and peritoneum during peritonitis. *J. Surg. Res.* 74, 119-124.
46. FUKUDA, O., ENDO, S. und KUWAYMA, N. (1995). The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery* 36, 358-364.
  47. FURCHGOTT, R.F., und ZAWADZKI, J.V.(1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373-376.
  48. GARG, U. C. und HASSID, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* 83, 1774-1777.
  49. GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L., NIELSEN, E.B., SCHMIDT, K. und MAYER, B.(1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 48, 184-188.
  50. GEORGE, T. N., JOHNSON, K. J., BATES, J. N. und SEGAR, J. L. (1998). The effect of inhaled nitric oxide therapy on bleeding time and platelet aggregation in neonates. *J. Pediatr.* 132, 731-734.
  51. GERMANN, P., BRASCHI, A., DELLA ROCCA, G., DINH-XUAN, A. T., FALKE, K., FROSTELL, C., GUSTAFSSON, L. E., HERVÉ, P., JOLLIET, P., KAISERS, U., LITVAN, H., MACRAE, D. J., MAGGIORINI, M., MARCZIN, N., MUELLER, B., PAYEN, D., RANUCCI, M., SCHRANZ, D., ZIMMERMANN, R. und ULLRICH, R. (2005). Inhaled nitric oxide therapy in adults: European expert recommendations. *Intensive Care Med.* 31, 1029-1041.
  52. GIANETTI, J., DEL SARTO, P., BEVILACQUA, S., VASSALLE, C., DE FILIPPIS, R., KACILA, M., FARNETI, P.A., CLERICO, A., GLAUBER, M., BIAGINI, A. (2004). Supplemental nitric oxide and its effect on myocardial injury and function in patients undergoing cardiac surgery with extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127. 44–50.
  53. GLADWIN, M. T., CRAWFORD, J. H. und PATEL, R. P. (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic.Biol.Med.* 36[6], 707-717.
  54. GLADWIN, M. T., OGNIBENE, F. P., PANNELL, L. K., NICHOLS, J. S., PEASE-FYE, M. E., SHELHAMER, J. H. und SCHECHTER, A. N. (2000). Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric

- oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9943-9948.
55. GLADWIN, M. T., SHELHAMER, J. H., SCHECHTER, A. N., PEASE-FYE, M. E., WACLAWIWI, M. A., PANZA, J. A., OGNIBENE, F. P., CANNON, R. O., III. (2000). Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 97, 11482-11487.
  56. GLADWIN, M. T., WANG, X., REITER, C. D., YANG, B. K., VIVAS, E. X., BONAVENTURA, C., und SCHECHTER, A. N. (2002). S-Nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O<sub>2</sub>/NO-linked allosteric function. *J.Biol.Chem.* 277[31], 27818-27828.
  57. GOETZ, R. M., THATTE, H. S., PRABHAKAR, P., CHO, M. R., MICHEL, T., GOLAN, D. E. (1999). Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96. 2788-2793.
  58. GODBER, B. L., DOEL, J. J., SAPKOTA, G. P., BLAKE, D. R., STEVENS, C. R., EISENTHAL, R. und HARRISON, R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J.Biol.Chem.* 275[11], 7757-7763.
  59. GOTOH, J., KUANG, T. Y., NAKAO, Y., COHEN, D. M., MELZER, P., ITOH, Y., PAK, H., PETTIGREW, K. und SOKOLOFF, L. (2001). Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280[2], H821-H829.
  60. GOW, A. J. und STAMLER, J. S. (1998). Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391[6663], 169-173.
  61. GRANDATI, M., VERRECCHIA, C., REVAUD, M. L., ALLIX, M., BOULU, R. G. und PLOTKINE, M. (1997). Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br. J. Pharmacol.* 122, 625-630.
  62. GRIES, A., HERR, A., KIRSCH, S., GUNTHER, C., WEBER, S., SZABO, G., HOLZMANN, A., BOTTIGER, B.W., MARTIN, E. (2003). Inhaled nitric oxide inhibits platelet-leukocyte interactions in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 31,1697-1704.
  63. GUYTON, A. C. (1947). Measurement of respiratory volumes of laboratory animals. *Am J Physiol.*150,70-77.
  64. HACKE, W., BROTT, T., CAPLAN, L., MEIER, D., FIESCHI, C., VON KUMMER, R., DONNAN, G., HEISS, W. D., WAHLGREN, N.G., SPRANGER, M., BOYSEN, G.,

- MARLER, J. R. (1999) Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology* 53: S3-14.
65. HAKIM, A. M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can.J.Neurol.Sci.* 14[4], 557-559.
66. HARRIS, B.D., MOODY, E.J., BASILE, A.S., SKOLNICK, P. (1994). Volatile anesthetics bidirectionally and stereospecifically modulate ligand binding to GABA receptors. *Eur J Pharmacol* 267. 269-274.
67. HATAISHI, R., RODRIGUES, A.C., NEILAN, T.G., MORGAN, J.G., BUYS, E., SHIVA, S., TAMBOURET, R., JASSAL, D.S., RAHER, M.J., FURUTANI, E., ICHINOSE, F., GLADWIN, M.T., ROSENZWEIG, A., ZAPOL, W. M., PICARD, M.H., BLOCH, K.D., SCHERRER-CROSBIE, M. (2006). Inhaled nitric oxide decreases infarction size and improves left ventricular function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(1). H379-84.
68. HEROLD, S. und REHMANN, F. J. (2003). Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radic.Biol.Med.* 34[5], 531-545.
69. HESS, J .R., MACDONALD, V. W. und BRINKLEY, W. W. (1993). Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J.Appl.Physiol* 74[4], 1769-1778.
70. HILLMAN, N. D., CHEIFETZ, I. M., CRAIG, D. M., SMITH, P. K., UNGERLEIDER, R. M. und MELIONES, J. N. (1997). Inhaled nitric oxide, right ventricular efficiency, and pulmonary vascular mechanics: selective vasodilation of small pulmonary vessels during hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 113[6], 1006-1013.
71. HOBBS, A. J. (1997). Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.* 18,484-491
72. HOFFMAN, W. E., THOMAS, C. und ALBRECHT, R. F. (1993). The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesthe. Analg.* 76, 279-283.
73. HOGMAN, M., FROSTELL, C., AANBERG, H., SANDHAGEN, B. und HEDENSTIERNA, G. (1994). Prolonged bleeding time during nitric oxide inhalation in the rabbit. *Acta Physiol Scand.* 151[1], 125-129.
74. HUANG, Z., HUANG, P. L., MA, J., MENG, W., AYATA, C., FISHMAN, M. C. und MOSKOWITZ, M. A. (1996). Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase

- knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 16, 981-987.
75. IADECOLA, C., ZHANG, F., XU, S., CASEY, R., und ROSS, M. E. (1995). Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 15, 378-384.
  76. ISHIKAWA, M., COOPER, D., RUSSELL, J., SALTER, J. W., ZHANG, J. H., NANDA, A. und GRANGER, D. N. (2003). Molecular determinants of the prothrombogenic and inflammatory phenotype assumed by the postischemic cerebral microcirculation. *Stroke*. 34(7),1777-82.
  77. ITO, H., WATANABE, Y., ISSHIKI, A., UCHINA, H. (1999). Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol. Scand*. 43, 153–162.
  78. JIA, L., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J., STAMLER, J. S. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 380(6571); 221-6.
  79. JOLKKONEN, J., PUURUNEN, K., KOISTINAHO, J., KAUPPINEN, R., HAAPALINNA, A., NIEMINEN, L., SIVENIUS, J. (1999). Neuroprotection by the alpha2-adrenoceptor agonist, dexmedetomidine, in rat focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol*. 372, 31–36.
  80. KANWAR, S. und KUBES, P. (1995). Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes. *New Horiz*. 3, 93-104.
  81. 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.
  82. KATAOKA, H., KIM, S.W. und PIESNILA, N.(2004). Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 24,668-676.
  83. KATAYAMA, Y., HATANAKA, K., HAYASHI, T., ONODA, K., YADA, I., NAMKAWA, S., YUASA, H., KUSAGAWA, M., MARUYAMA, K. und KITABATAKE, M. (1994). Effects of inhaled nitric oxide in rats with chemically induced pulmonary hypertension. *Respir.Physiol* 97[3], 301-307.

84. KATSOUYANNI, K. (2003). Ambient air pollution and health. *Br.Med Bull.* 68, 143-156.
85. KIELBASA, W.B., FUNG, H.L. (2001). Systemic biochemical effects of inhaled NO in rats: increased expressions of NOS III, nitrotyrosine-, and phosphotyrosine-immunoreactive proteins in liver and kidney tissues. *Nitric Oxide* 5,587–594.
86. KOENIG, H. M., PELLIGRINO, D. A., und ALBRECHT, R. F.(1993). Halothane vasodilation and nitric oxide in rat pial wessels. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 5, 264-271.
87. KOMAROV, A., MATTSON, D., JONES, M. M., SINGH, P. K., LAI, C. S., (1993). In vivo spin trapping of nitric oxide in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195. 1191-1198.
88. KOREIN, J., GELLER, M., ROSENBLUM, W.I., LEVIDOW, L. (1966). Effects of a vasoactive drug (nylidrin HCl) on the response of the electroencephalogram to hyperventilation. *Arch Neurol.* 14,202–207.
89. KUBES, P., SUZUKI, M. und GRANGER, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88[11], 4651-4655.
90. KUEBLER, W.M., KISCH-WEDEL, H., KEMMING, G.I., MEISNER, F., BRUHN, S., KOEHLER, C., FLONDOR, M., MESSMER, K., ZWISSLER, B. (2003). Inhaled nitric oxide induces cerebrovascular effects in anesthetized pigs. *Neurosci Lett* 348, 85–88.
91. LANGFORD, E. J., BROWN, A. S., WAINWRIGHT, R. J., DE BELDER, A. J., THOMAS, M. R., SMITH, R. E., RADOMSKI, M. W., MARTIN, J. F. und MONCADA, S. (1994). Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 344, 1458-1460.
92. LAI, Y.L., CHOU, H. (2000). Respiratory mechanics and maximal expiratory flow in the anesthetized mouse. *J Appl Physiol* 88, 939–43.
93. LASSEN, N. A. (1990). Pathophysiology of brain ischemia as it relates to the therapy of acute ischemic stroke. *Clin. Neuropharmacol.* 13 Suppl 3, S1-S8.
94. LEIKERT, J., RATHEL, T.R., MULLER, C., VOLLMAR, A. M., DIRSCH, V. M. (2001). Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using lo concentrations of the fluorescent probe 4,5-diamonofluorescein. *FEBS Lett.* 506. 131-134.
95. LI, H., SAMOUILOV, A., LIU, X. und ZWEIER, J. L. (2003). Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of

- its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry* 42[4], 1150-1159.
96. LINCOLN, T. M. und CORNWELL, T. L. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7[2], 328-338.
  97. LOPES CARDOZO, R. H., DE BEAUFORT, A. J., GESINK, B. J., MOISON, R. M., VAN DE, B. M., BERGER, H. M. und VAN BEL, F. (1996). Inhalation of nitric oxide: effect on cerebral hemodynamics and activity, and antioxidant status in the newborn lamb. *Biol.Neonate* 69[4], 284-292.
  98. MA, X. L., WEYRICH, A. S., LEFER, D. J. und LEFER, A. M. (1993). Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ.Res.* 72[2], 403-412.
  99. MACARTHUR, P. H., SHIVA,S. und GLADWIN, M. T. (2007). Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* .
  100. MCMAHON, T. J., MOON, R. E., LUSCHINGER, B. P., CARRAWAY, M. S., STONE, A. E., STOLP, B. W., GOW, A. J., PAWLOSKI, J. R., WATKE, P., SINGEL, D. J., PIANTADOSI, C. A. und STAMLER, J. S. (2002). Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat.Med.* 8[7], 711-717.
  101. MAIER, C., STEINBERG, G.K., SUN, G.H., ZHI, G.T., MAZA, M. (1993). Neuroprotection by the alpha 2-adrenoreceptor agonist dexmedetomidine in a focal model of cerebral ischemia. *Anesthesiology* 79. 306–312.
  102. MAO, Y., YANG, G., ZHOU, L. (2000). Temporary and permanent focal cerebral ischemia in the mouse: assessment of cerebral blood flow, brain damage and blood-brain barrier permeability. *Chin Med. J. (Engl.)* 113, 361-366.
  103. MAY, G. R., CROOK, P., MOORE, P. K. und PAGE, C. P. (1991). The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *Br.J.Pharmacol.* 102[3], 759-763.
  104. MEADOW, W., BENN, A., GIARDINI, N., HAGEMAN, J. und BERGER, S. (1986). Clinical correlates do not predict PaO<sub>2</sub> response after tolazoline administration in hypoxic newborns. *Crit Care Med.* 14[6], 548-551.
  105. MEGYESI, J.F., VOLLRATH, B., COOK, D.A., FINDLDAY, J.M. (2000). In vivo animal models of cerebral vasospasm. *Neurosurgery.* 46(2), 448-60.

106. MESTAN, K.K., MARKS, J. D., HECOX, K., HUO, D., SCHREIBER, M.D. (2005). Neurodevelopmental outcomes of premature infants treated with inhaled nitric oxide. *N Engl J Med* 353. 23–32.
107. MIAO, N., FRAZER, M. J., LYNCH, C, III. (1995). Volatile anesthetics depress Ca<sup>2+</sup> transients and glutamate release in isolated cerebral synaptosomes. *Anesthesiology* 83, 593-603.
108. MILLER, D. H., THOMPSON, A. J., MORRISSEY, S. P., MACMANUS, D. G., MOORE, S. G., KENDALL, B. E., MOSELEY, I. F. und MCDONALD, W. (1992). High dose steroids in acute relapses of multiple sclerosis: MRI evidence for a possible mechanism of therapeutic effect. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 55(6),450-3.
109. MISKO, T. P., SCHILLING, R. J., SALVEMINI, D., MOORE, W. M., CU/RRIE, M. G. (1993). A fluoremetric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem*. 214. 11-16.
110. MOENKHOFF, M., SCHMITT, B., WOHLRAB, G., WALDVOGEL, K., FANCONI, S., BAENZIGER, O. (1998). Electroencephalogram changes during inhalation with nitric oxide in the pediatric intensive care patient: a preliminary report. *Crit Care Med* 26.1887–1892.
111. MONCADA, S., PALMER, R.M.J., und HIGGS, E.A. (1991).Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 49, 109-142.
112. MORO, M.A., RUSSELL, R.J., CELLEK, S., LIZASOAIN, I., SU, Y., DARLEY-USMAR, V.M., RADOMSKI, M.W. und MONCADA, S. (1996). cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 1480-1485.
113. NAGANO, T., YOSHIMURA, T. (2002). Bioimaging of nitric oxide. *Chem. Rew*. 102. 1235-1270.
114. NAKATSUBO, N., KOJIMA, H., KIKUCHI, K., URANO, Y., HIGUCHI, T., TANAKA, J., KUDO, Y., NAGANO, T.(1998). Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamiNOfluoresceins. *FEBS Lett*. 427. 263-266.
115. NARIMATSU, E., TSAI, Y. C., GERHOLD, T. D., KAMATH, S. H., DAVIES, L. R., SOKOLL, M. D. (1996). A comparison of the effect of halothane on N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Anesth Analg* 82. 843-847.

116. NISHIDA, J., MCCUSKEY, R. S., MCDONNELL, D. und FOX, E. S. (1994). Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am.J.Physiol* 267[6 Pt 1], G1135-G1141.
117. NISSL, F., SCHRÖDER, P., RANKE, O. (1926). Nervensystem. In *Enzyklopädie der mikroskopischen Technik* (Krause, R., ed.), S.1636-1654. Urban und Schwarzenberg, Berlin, 3. Auflage.
118. NIU, X. F., SMITH, C. W. und KUBES, P. (1994). Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ.Res.* 74[6], 1133-1140.
119. OHUCHI, T., KUWAKI, T., LING, G.Y., DEWIT, D., JU, K.H., ONODERA, M., CAO, W.H., YANAGISAWA, M., KUMADA, M. (1999). Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol* 276, R1071–7.
120. ÖZDEN, S., ISENMANN, S. (2004). Neuroprotective properties of different anesthetics on axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *Neurotrauma. J Neurotrauma.* 21(1), 73-82.
121. PALMER, R. M., FERRIGE, A. G., MONCADA, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526
122. PALMER, R. M., ASHTON, D.S., und MONCADA, S. (1987) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333, 664-666.
123. PAWLIK, G., RACKL, A. und BING, R. J. (1981). Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res.* 208, 35-58.
124. PATEL, R. P., HOGG, N., SPENCER, N. Y., ALYANARAMAN, B., MATALON, S. und DARLEY-USMAR, V. M. (1999). Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin. Effects on oxygen binding and transnitrosation. *J.Biol.Chem.* 274[22], 15487-15492.
125. PEPKE-ZABA, J., HIGENBOTTAM, T. W., DINH-XUAN, A. T., STONE, D. und WALLWORK, J. (1991). Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338[8776], 1173-1174.
126. PLESNILA, N., PUTZ, C., RINECKER, M., WIEZORREK, J., SCHLEINKOFER, L., GOETZ, A. E., KUEBLER, W. M. (2002). Measurement of absolute values of hemoglobin oxygenation in the brain of small rodents by near infrared reflection

- spectrophotometry. *J Neurosci Meth* 114, 107-117.
127. QI, K., QIU, H., RUTHERFORD, J., ZHAO, Y., NANCE, D. M., ORR, F. W. (2004). Direct visualization of nitric oxide release by liver cells after the arrest of metastatic tumor cells in the hepatic microvasculature. *J. Surg. Res.* 119. 29-35.
  128. RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M., und MONCADA, S. (1990). An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 5193-5197.
  129. RASSAF, T., BRYAN, N. S., KELM, M., und FEELISCH, M. (2002). Concomitant presence of N-nitroso and S-nitrosoproteins in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1590-1596.
  130. RASSAF, T., BRYAN, N. S., MALONEY, R. E., SPECIAN, V., KELM, M., KALYANARAMAN, B., RODRIGUEZ, J. und FEELISCH, M. (2003). NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little? *Nat.Med.* 9[5], 481-482.
  131. RATHIEL, T. R., LEIKERT, J. J., VOLLMAR, A. M., DIRSCH, V. M. (2003). Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. *Biol. Proce. Online* 5. 136-142.
  132. REED, S. D., CRAMER, S. C., BLOUGH, D. K., MEYER, K., JARVIK, J. G. (2001). Treatment with tissue plasminogen activator and inpatient mortality rates for patients with ischemic stroke treated in community hospitals. *Stroke* 32, 1832–1840.
  133. REIVICH, M. (1964). Arterial PCO<sub>2</sub> and cerebral hemodynamics. *Am J Physiol.* 216, 25–35.
  134. RUDINSKY, B. F., KOMAR, K. J., STRATES, E., und MEADOW, W. L. (1987). Neither nitroglycerin nor nitroprusside selectively reduces sepsis-induced pulmonary hypertension in piglets. *Crit Care Med.* 15, 1127-1130.
  135. SAITO, R., GRAF, R., HUBEL, K., FUJITA, T., ROSNER, G. und HEISS, W. D. (1997) Reduction of infarct volume by halothane: effect on cerebral blood flow or perifocal spreading depression-like depolarizations *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 17, 857-864.
  136. SARRAF, Y. S., SHENG, H., BRINKHOUS, A. D., PEARLSTEIN, R. D. und WARNER, D. S. (1999). Effects of postischemic halothane administration on outcome from transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 11, 31-36.
  137. SCHECHTER, A. N., GLADWIN, M. T. und CANNON, R. O., III. (2002). NO solutions? *J.Clin.Invest* 109[9], 1149-1151.

138. SCHNEIDER, A., MARTIN-VILLALBA, A., WEIH, F., VOGEL, J., WIRTH, T. und SCHWANINGER, M. (1999). NF- $\kappa$ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med.* 5, 554–559.
139. SHIBATA, M., ARAKI, N., HAMADA, J., SASAKI, T., SHIMAZU, K. und FUKUUCHI, Y. (1996). Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 734[1-2], 86-90.
140. SHIBUKI, K. (1990). An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci. Res.* 9. 69-76.
141. SMITH, A. L., LARSON-CP, J. und HOFF, J. T. (1973). Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology* 39, 377-381.
142. SOIFER, S. J., CLYMAN, R. I. und HEYMANN, M. A. (1988). Effects of prostaglandin D2 on pulmonary arterial pressure and oxygenation in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J.Pediatr.* 112[5], 774-777.
143. STAMLER, J. S., JARAKI, O., OSBORNE, J., SIMON, D. I., KEANEY, J., VITA, J., SINGEL, D., VALERI, C. R. und LOSCALZO, J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89[16], 7674-7677.
144. STAMLER, J.S., JIA, L., EU, J.P., MCMAHON, T.J., DEMCHENKO, I.T., BONAVENTURA, J., GERNERT, K., PIANTADOSI, C.A. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 276(5321), 2034-7.
145. STAMLER, J. S., SIMON, D. I., JARAKI, O., OSBORNE, J. A., FRANCIS, S., MULLINS, M., SINGEL, D., und LOSCALZO, J. (1992). S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 444-448.
146. STEVENSON, D. K., KASTING, D. S., DARNALL, R. A., JR., ARIAGNO, R. L., JOHNSON, J. D., MALACHOWSKI, N., BEETS, C. L. und SUNSHINE, P. (1979). Refractory hypoxemia associated with neonatal pulmonary disease: the use and limitations of tolazoline. *J.Pediatr.* 95[4], 595-599.
147. SUGIMURA, T., SAKO, K., TOHYAMA, Y. und YONEMASU, Y. (1998). Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. *Brain Res.* 808[2], 313-316.

148. TAGUCHI ,J., ABE, J., OKAZAKI, H., TAKUWA, Y. und KUROKAWA ,K. (1993). L-arginine inhibits neointimal formation following balloon injury. *Life Sci.* 53[23], L387-L392.
149. TANAKA, K. (1996). Is nitric oxide really important for regulation of the cerebral circulation? Yes or no? *Keio J. Med.* 45, 14-27.
150. TANKERSLEY, C., G FRITZGERALD, R. S., und KLEEBERGER, S. R. (1994). Differential control of ventilation among inbred strains of mice. *Am J Physiol.* 267 (36),R1371-R1377.
151. TAYLOR, T.N., DAVIS, P.H., TORNER, J. C., HOLMES,J., MEYER, J. W. und JACOBSON, M. F.(1996). Lifetime Cost of Stroke in the United States. *Stroke.* 27, 1459-1466.
152. THAL, S. C., PLESNILA, N. (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO<sub>2</sub> during surgical anesthesia in mice. *J Neurosci Methods.* 159(2), 261-7.
153. THOMASSEN, L., BRAININ, M., DEMARIN, V., GROND, M., TONI, D., VENABLES, G.S. (2003). Acute stroke treatment in Europe: a questionnaire-based survey on behalf of the EFNS Task Force on acute neurological stroke care. *Eur J Neurol* 10. 199-204.
154. TRONCY, E., FRANCOEUR, M., SALAZKIN, I., YANG, F., CHARBONNEAU, M., LECLERC, G., VINAY, P., BLAISE, G. (1997). Extra-pulmonary effects of inhaled nitric oxide in swine with and without phenylephrine. *Br J Anaesth.* 79(5), 631-40.
155. TSAI, A.G., JOHNSON, P.C., INTAGLIETTA, M. (2003). Oxygen gradients in the microcirculation. *Physiol. Rev.* 83, 933-963.
156. UHL, E., BECK, J., STUMMER, W., LEHMBERG, J., BAETHMANN, A. (2000). Leukocyte-endothelium interactions in pial venules during the early and late reperfusion period after global cerebral ischemia in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(6), 979-87.
157. WALTZ, A.G.(1979). Clinical relevance of models of cerebral ischemia. *Stroke.* 10(2), 211-213.
158. WARNER, D. S., MCFARLANE, C., TODD, M. M., LUDWIG, P. und MCALLISTER, A. M.(1993). Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation. *Anesthesiology* 79, 985-992.

159. WARNER, D. S., ZHOU, J. G., RAMANI, R., und TODD, M. M. (1991). Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, und methohexital anesthesia. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 11, 794-802.
160. WEINBERGER, B., LASKIN, D. L., HECK, D. E. und LASKIN, J. D. (2001). The Toxicology of Inhaled Nitric Oxide. *Toxicological Sciences* 59[1], 5-16.
161. WHITE, R. P., VALLANCE, P. und MARKUS, H. S. (2000). Effect of inhibition of nitric oxide synthase on dynamic cerebral autoregulation in humans. *Clin.Sci.(Lond)* 99[6], 555-560.
162. WOLZT, M., MACALLISTER, R. J., DAVIS, D., FEELISCH, M., MONCADA, S., VALLANCE, P. und HOBBS, A. J. (1999). Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity. *J.Biol.Chem.* 274[41], 28983-28990.
163. YAMADA, M., HUANG, Z., DALKARA, T., ENDRES, M., LAUFS, U., WAEBER, C., HUANG, P. L., LIAO, J. K. und MOSKOWITZ, M. A. (2000). Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 20[4], 709-717.
164. YAMAKAWA, T., YAMAGUCHI, S., NIIMI, H. und SUGIYAMA, I. (1987). White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study. *Circ. Shock* 22, 323-332.
165. YOSHIDA, T., WAEBER, C., HUANG, Z. und MOSKOWITZ, M. A. (1995). Induction of nitric oxide synthase activity in rodent brain following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci. Lett.* 194, 214-218.
166. ZHANG, Z., NAUGHTON, D., WINYARD, P. G., BENJAMIN, N., BLAKE, D. R. und SYMONS, M. C. (1998). Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 767-772.
167. ZWEIER, J. L., WANG, P., SAMOUILOV, A. und KUPPUSAMY, P. (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat.Med.* 1[8], 804-809.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(international gebräuchliche Abkürzungen wurden beibehalten)

A./Aa.:	Arteria/Arteriae
BHS:	Blut-Hirnschranke
CAMAS:	Computer assisted microcirculation analysis system
CBF:	Hirndurchblutung (cerebral blood flow)
CCD:	Charge coupled device (Chip in elektronischen Videokameras)
CMV:	Kontrollierte mechanische Ventilation (controlled mechanical ventilation)
CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxid
DAF-FM:	4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorofluorescein
Dx:	Dextran
FITC:	Fluoreszeinisothiocyanat
INO:	inhaliertes Stickstoffmonoxid
I/R:	Ischämie/Reperfusion
IVM:	Intravitalmikroskopie/Intravitalmikroskop
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenos
KG:	Körpergewicht
KO:	knock-out
LDF:	Laser-Doppler-Fluxmetrie
MAP:	Mittlerer arterieller Blutdruck (mean arterial pressure)
MCA:	Arteria cerebri media (middle cerebral artery)
MCAo:	Okklusion der Arteria cerebri media (middle cerebral artery occlusion)
MG:	Molekulargewicht
MW:	Mittelwert
N./Nn.:	Nervus/Nervi
NO:	Stickstoffmonoxid
ODQ:	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-ein
P <sub>art</sub> CO <sub>2</sub> :	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid im arteriellen Blut
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> :	Partialdruck von Sauerstoff im arteriellen Blut
P <sub>ET</sub> CO <sub>2</sub> :	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid im Ende des Atemzug
rCBF:	regionale Hirndurchblutung (regional cerebral blood flow)
RR:	Atemfrequenz (respiratory rate)
s.c.:	subkutan

SEM:	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SD:	Standard Abweichung (standard deviation)
SND:	Selektiver Nervenzelltod (selective neuronal death)
SNO-Hb:	S-nitroso-Hämoglobin
SITS:	silikon-intensified target system
Ti/Tt:	inspiratory fraction
V.:	Vena
Ve:	minute volume
Vt:	Atemzugvolumen (tidal volume)

## 9 PUBLIKATIONEN

- **Kim SW**, Shim KW, Plesnila N, Kim YO, Choi JU, Kim DS.  
Distraction vs remodeling surgery for craniosynostosis.  
Childs Nerv Syst. 2007 Feb;23(2):201-6.
- Zweckberger K, Erös C, Zimmermann R, **Kim SW**, Engel D, Plesnila N.  
Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice.  
J Neurotrauma. 2006 Jul;23(7):1083-93.
- Gröger M, Bebesgue D, Pruneau D, Relton J, **Kim SW**, Nussberger J, Plesnila N.  
Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice.  
J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Aug;25(8):978-89.
- Kataoka H, **Kim SW**, Plesnila N.  
Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice.  
J Cereb Blood Flow Metab. 2004 Jun;24(6):668-76.

## 10 DANKSAGUNG

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, München, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. N. Plesnila durchgeführt.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut danken. Sein scharfer Verstand und sein wissenschaftliches Engagement waren mir stets Vorbild.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. Baethmann gilt mein ganz herzlicher Dank für die Aufnahme und Integration in seine der Arbeitsgruppe. Mit seiner Hilfe konnte ich mein Medizinstudium in Deutschland abschließen, da mein Studium in China nur teilweise anerkannt wurde. Sein Einsatz für die Ausbildung seiner Doktoranden nicht nur in Wissenschaft und Klinik sondern auch in gesellschaftlichen Werten wurde für mich Sinnbild akademischen Denkens und Handelns.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. N. Plesnila möchte ich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit und die weitere Unterstützung meines beruflichen Werdeganges danken. Er hat mich in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit bestärkt und unterstützt.

Herrn Dr. med. S. Thal sei für die Hilfe bei der Etablierung des NO-Inhalationsprotokolls gedankt.

Herrn PhD. MD. H. Kataoka sei für seine Hilfe und Unterstützung bei den Versuchen zur fokalen Ischämie gedankt.

Herrn Dr. med. Raimund Trabold, Herrn Dr. Med. Karsten Schöller und Frau Dr. med. Nicole Terpolilli sei für ihre unschätzbare Hilfe bei der Korrektur meiner Dissertation gedankt.

Größter Dank gilt auch Frau Uta Mamrak, welche die histologische Aufarbeitung der Gehirne übernommen hat.

Der Kollegialität und Hilfsbereitschaft jedes einzelnen Mitarbeiters der Arbeitsgruppe für Experimentelle Neurochirurgie und des Instituts für Chirurgische Forschung ist die hervorragende Arbeitsatmosphäre am Institut zu verdanken. Ich habe von allen Seiten immer größte Unterstützung erfahren.

An dieser Stelle möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern Young Sook Kim und Chong Ho Kim bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin und diese Doktorarbeit ermöglichten und mich zu jeder Zeit mit all ihrer Kraft in allen Höhen und Tiefen unterstützten.

## 11 LEBENSLAUF

Seong Woong Kim

Geburtsdatum 11.Juli 1973

Eltern Kim, Chong Ho  
Kim, Young Sook

Geschwister Kim, Danbee

Schulbildung 1980-1983 Balsan Elementary School, Seoul, Korea  
1984-1986 Naebalsan Elementary School, Seoul, Korea  
1986- 1989 Deokwon Middle School, Seoul, Korea  
1989- 1992 Myungduk High School, Seoul, Korea

Studium I (Teil 1) 1993- 1994 Humanmedizin an der Qingdao University Medical  
College, Qingdao, China

Wehrdienst 1994- 1995 Südkoreanische Armee

Studium I (Teil 2) 1996- 2000 Humanmedizin an der Qingdao University Medical  
College, Qingdao, China

Studium II 2002- 2007 Humanmedizin an der technischen Universität München

Promotion 2000-2001 Stipendiat des DFG Graduiertenkollegs  
„Neurotraumatologie und Neuropsychologische  
Rehabilitation" Institut für Chirurgische Forschung, LMU  
München  
2001-2006 Institut für Chirurgische Forschung, LMU München bei  
Prof. N. Plesnila

Praktikum 1999- 2000 Internship Course in the Affiliated Hospital of Qingdao  
University, Qingdao, China  
Chirurgie Severance Hospital, Yeonsei University Medical  
College, Seoul, Korea  
Innere Klinikum rechts der Isar der TUM  
Neurologie Klinikum rechts der Isar der TUM

Beruf 2008- Wissenschaftliche Mitarbeiter der Neurochirurgischen  
Klinik und Poliklinik, Klinikum Grosshadern, München  
Leiter: Prof. J.-C. Tonn