

Aus der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim und dem
Universitätsklinikum Giessen, Klinik für Neurologie

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

**Das Makrosphärenmodell –
Evaluation eines neuen Tiermodells
zur Induktion
fokaler zerebraler Ischämien
an der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
MAUREEN ILONA WALBERER
Tierärztin aus Essen (NRW)

Giessen 2005

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-44-8

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim und dem
Universitätsklinikum Giessen, Klinik für Neurologie

Betreuer: Prof. Dr. G. Bachmann

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

im Fachbereich vertreten durch: PD Dr. J. Roth

**Das Makrosphärenmodell-
Evaluation eines neuen Tiermodells zur Induktion
fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
MAUREEN ILONA WALBERER
Tierärztin aus Essen (NRW)

Giessen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Bachmann

2. Berichterstatter: PD Dr. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2005

Meinen Eltern und Michael

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
1.	HINTERGRUND	1
2.	ZIELSETZUNG	3
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
1.	EINSATZ VON NAGERN IN DER EXPERIMENTELLEN SCHLAGANFALLFORSCHUNG	5
2.	VERGLEICHENDE ANATOMIE DES GEHIRNS VON RATTE UND MENSCH	5
3.	PATHOPHYSIOLOGIE DES SCHLAGANFALLS	8
3.1.	<i>Das Penumbra-Konzept</i>	8
3.2.	<i>Die postischämische Kaskade</i>	9
3.2.1.	Exzitotoxizität und Periinfarktdepolarisation	10
3.2.2.	Freie Radikale	13
3.2.3.	Inflammation	14
3.2.4.	Apoptose	15
4.	DER NMDA-REZEPTOR UND DIE NMDA-ANTAGONISTEN	16
5.	TECHNIKEN ZUR INDUKTION FOKALER ZEREBRALER ISCHÄMIEN AN DER RATTE	19
5.1.	<i>Endovaskuläre Modelle</i>	19
5.1.1.	Das Fadenmodell	19
5.1.2.	Makrosphärenmodell	20
5.1.3.	Mikrosphärenmodell	21
5.1.4.	Thromboembolie-Modell	21
5.1.5.	Arachidonat-induziertes-Thrombose-Modell	22
5.2.	<i>Nicht-Endovaskuläre Modelle</i>	22
5.2.1.	Photothrombosemodell	22
5.2.2.	Intrazerebrale Endothelin-Injektion	23
5.2.3.	Clip-Modell	23
5.2.4.	Ligatur-Modell	23
5.2.5.	Okklusion mittels Kauterisierung	24
6.	DIE KERNSPINTOMOGRAPHIE AN DER RATTE	24
6.1.	<i>Physikalische Grundlagen</i>	24
6.2.	<i>Die MRT-Morphologie des Rattengehirns</i>	29
6.2.1.	T2-gewichtete Bildgebung	29
6.2.2.	MR-Angiographie	30
III.	MATERIAL UND METHODEN	31
1.	ALLGEMEIN	31
1.1.	<i>Versuchstiere</i>	31
1.2.	<i>Narkose</i>	31
1.3.	<i>Operationstechniken</i>	31
1.3.1.	Fadenmodell - Permanenter Verschluss der A. cerebri media	31
1.3.2.	Fadenmodell - Ischämie-Reperfusionmodell	32
1.3.3.	Makrosphärenmodell – Permanenter Verschluss der A. cerebri media	33

1.4. Physiologische Parameter	34
1.4.1. Blutentnahme und Analyse	34
1.4.2. Blutgase und Blutdruck	35
1.5. MRT-Technik	35
1.5.1. Fixierung der Versuchstiere	35
1.5.2. Der Magnetresonanztomograph	36
1.5.3. Bildgebung	36
1.5.3.1. Localizer	36
1.5.3.2. Feinjustierung	36
1.5.3.3. Diffusionsgewichtete Bildgebung	37
1.5.3.4. T2-Bildgebung	38
1.5.3.5. Protonen- und T2-gewichtete Bildgebung	38
1.5.3.6. Arterielle Magnetresonanztomographie	38
1.6. Klinisch-neurologische Beurteilung	39
1.7. Gewebeuntersuchung	40
1.7.1. Probenentnahme	40
1.7.2. TTC-Färbung	41
1.7.3. Computergestützte Planimetrie	42
1.8. Statistische Auswertung	43
1.9. Testsubstanzen und Applikationstechnik	43
2. STUDIENDESIGN	43
2.1. Experiment I: Neuroprotektionsstudie mit Dizocilpin	44
2.1.1. Ziel	44
2.1.2. Versuchsgruppeneinteilung	44
2.1.2. Studienablauf	45
2.1.3. Ausschlusskriterien	46
2.1.4. Datenanalyse und statistische Auswertung	46
2.2. Experiment II: Vergleich der Komplikationen des Faden- und Makrosphärenmodells	46
2.2.1. Ziel	46
2.2.2. Versuchsgruppeneinteilung	47
2.2.3. Studienablauf	47
2.2.3.1. Pilotstudie	47
2.2.3.2. Studienaufbau der Hauptstudie	48
2.2.4. Ausschlusskriterien	48
2.2.5. Bestimmung von Infarktgröße und Gefäßverschlüssen	49
2.2.6. Datenanalyse und statistische Auswertung	49
2.3. Experiment III: Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Kernspintomographen („In-bore-Okklusion“)	50
2.3.1. Ziel	50
2.3.2. Versuchsgruppeneinteilung	50
2.3.3. Studienablauf	50
2.3.4. Ein- und Ausschlusskriterien	51
2.3.5. Bestimmung der Infarktvolumen, des ADC und der T2-Relaxationszeit	51
2.3.6. Datenanalyse und statistische Auswertung	53

IV. ERGEBNISSE	55
1. EXPERIMENT I: NEUROPROTEKTIONSSTUDIE MIT DIZOCILPIN	55
1.1. <i>Ausschlussrate</i>	55
1.2. <i>Physiologische Parameter</i>	55
1.3. <i>Klinische Befunde</i>	57
1.4. <i>Post-mortem Befunde</i>	57
2. EXPERIMENT II: VERGLEICH DER KOMPLIKATIONEN DES FADEN- UND MAKROSPHÄRENMODELLS ..	60
2.1. <i>Pilotstudie</i>	60
2.2. <i>Hauptstudie</i>	60
2.2.1. <i>Körperkerntemperatur</i>	60
2.2.2. <i>Klinisch-neurologischer Befund</i>	62
2.2.3. <i>Kernspintomographische Befunde</i>	62
2.2.3.1. <i>T2-gewichtete Bildgebung</i>	62
2.2.3.2. <i>Arterielle MR-Angiographie</i>	63
2.2.4. <i>Histopathologische Befunde</i>	64
2.2.5. <i>Modellversagerquote und Fehlerquellen</i>	65
3. EXPERIMENT III: VERSCHLUSS DER A. CEREBRI MEDIA INNERHALB DES KERNSPINTOMOGRAPHEN („IN-BORE-OKKLUSION“)	67
3.1. <i>Physiologische Parameter</i>	67
3.2. <i>Läsionsgröße und deren Verteilung</i>	67
3.3. <i>Quantifizierung des zytotoxischen Hirnödems (ADC)</i>	68
3.4. <i>Quantifizierung des vasogenen Hirnödems (T2-Relaxationszeit)</i>	69
3.5. <i>Klinisch-neurologischer Befund</i>	71
3.6. <i>Histopathologische Befunde</i>	71
V. DISKUSSION	73
1. EINLEITUNG	73
2. FADENMODELL UND MAKROSPHÄRENMODELL	76
2.1. <i>Das Fadenmodell</i>	76
2.2. <i>Das Makrosphärenmodell</i>	77
3. LASSEN SICH MIT DEM MAKROSPHÄRENMODELL TYPISCHE KOMPLIKATIONEN DES FADENMODELLS VERMEIDEN?	78
4. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HYPOTHALAMUSINFARKTEN UND HYPERTHERMIE	82
5. BEEINFLUSST DIE PATHOLOGISCHE HYPERTHERMIE TIEREXPERIMENTELLE NEUROPROTEKTIONSSTUDIEN?	84
6. VERBESSERT DIE VERWENDUNG DES MAKROSPHÄRENMODELLS DIE ÜBERTRAGBARKEIT TIEREXPERIMENTELL GEWONNENER ERKENNTNISSE AUF DEN MENSCHEN?	86
7. WEITERE ANWENDUNGEN FÜR DAS MAKROSPHÄRENMODELL: IN-BORE-OKKLUSION	87
8. SCHLUSSFOLGERUNG	91
VI. ZUSAMMENFASSUNG	95
VII. SUMMARY	99

VIII.	ANHANG	103
1.	MATERIALIEN	103
1.1.	<i>Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel</i>	<i>103</i>
1.2.	<i>Medikamente</i>	<i>103</i>
1.3.	<i>Operationszubehör</i>	<i>103</i>
1.4.	<i>Versuchstiere</i>	<i>104</i>
1.5.	<i>Geräte</i>	<i>104</i>
1.5.1.	Labor	104
1.5.2.	Operationsgeräte	104
1.5.3.	Magnetresonanztomographie	105
1.5.4.	Gewebeuntersuchung	105
2.	ABKÜRZUNGEN	106
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	107
X.	DANKSAGUNG	121

I. Einleitung

1. Hintergrund

Der Schlaganfall ist nach Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Weltweit verstarben 1999 5,5 Millionen Menschen infolge eines Schlaganfalls. Dies bedeutet, dass 10% aller Todesfälle durch einen Schlaganfall hervorgerufen werden.⁹⁶

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen intrakraniellen Blutungen (z.B. intrazerebrale Hämatome oder Subarachnoidalblutungen) und fokalen zerebralen Ischämien. Etwa 20 bis 25% aller Schlaganfälle werden durch Hirnblutungen verursacht, 75 bis 80% der Patienten erleiden zerebrale Ischämien, wobei etwa 40 bis 50% durch Thrombosen und 30 bis 35% durch Embolien hervorgerufen werden.

Zu den Hauptrisikofaktoren zählen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva, der Konsum von Nikotin, Alkoholmissbrauch, Störungen im Fettstoffwechsel, Übergewicht, Bewegungsmangel, koronare Herzerkrankungen und Migräne.³⁶ Die spezifischen Symptome des Patienten hängen von der Lokalisation des Hirninfarktes ab. Der Schlaganfall ist die häufigste Ursache für Behinderungen, da er bei der überwiegenden Anzahl der Patienten zu Lähmungserscheinungen und / oder zu neuropsychologischen Defiziten, wie z.B. Aphasie führt. Das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, steigt mit zunehmendem Alter an, obwohl auch immer mehr junge Menschen hiervon betroffen sind.³⁶

Die Diagnose eines Schlaganfalls basiert neben der Anamnese und den klinischen Befunden vorwiegend auf der zerebralen Bildgebung. Der direkte Nachweis eines Hirninfarktes und dessen Lokalisation erfolgt zumeist über ein zerebrales Computertomogramm oder ein Magnetresonanztomogramm.^{36,78} Nur mit diesen Techniken sind beispielsweise ischämische Schlaganfälle von Hirnblutungen sicher zu unterscheiden. Die Dopplersonographie erlaubt die Erhebung des zerebralen Gefäßstatus und kann sowohl zur Früherkennung von Risikofaktoren als auch in der Akutdiagnostik genutzt werden.^{9,36}

Bei der Therapie eines akuten Hirninfarktes gilt es, eine Begrenzung des eingetretenen Schadens zu erzielen, Komplikationen und Rezidiven vorzubeugen und in der Rehabilitationbehandlung die eingetretenen neurologischen Ausfälle zu vermindern. Die Therapieoptionen in der Akutphase sind derzeit noch sehr begrenzt.

Zur Akutbehandlung ist lediglich die systemische Thrombolyse mit rtPA (rekombinanter „tissue-type“ Plasminogen Aktivator) zugelassen. Diese kann nach vorherigem Ausschluss einer Hirnblutung bis maximal 3 Stunden nach Ischämiebeginn eingeleitet werden. Wegen der zahlreichen Komplikationen, insbesondere die Einblutung in das Infarktareal, ist die Anwendung dieser Substanz nur unter strenger Indikationsstellung und Beachtung zahlreicher Kontraindikationen möglich. Daher wird dieses Therapieverfahren derzeit nur bei etwa 2-5% aller Schlaganfallpatienten angewandt.^{36,47,66,114,141} Zur Sekundärprophylaxe werden sowohl Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS[®]) oder Clopidogrel (Iscover[®], Plavix[®]) als auch Coumadine (z.B. Marcumar[®]) eingesetzt.³⁶ Die bedrohlichste Komplikation in der Akutphase des ischämischen Schlaganfalls ist die Ausbildung eines vasogenen Hirnödems.^{5,63} Diese lebensgefährliche Komplikation wird durch eine Erhöhung des extrazellulären Wassergehaltes hervorgerufen.⁵ Bei ausgedehnten, zerebralen Ischämien entwickelt das Hirnödem einen erheblichen raumfordernden Effekt, der über die Verlagerung intrakranieller Strukturen zur zerebralen Herniation führen kann. Dieser Mechanismus ist für die überwiegende Zahl der Todesfälle in der Frühphase des Schlaganfalls verantwortlich.^{15,52} Ferner können die Erhöhung des intrakraniellen Drucks und die resultierende lokale Kompression von Kollateralgefäßen in den Randzonen des Infarktgebietes zu einer Minderung des regionalen zerebralen Blutflusses führen und so sekundäre Hirnschäden verursachen und das Infarktvolumen vergrößern.⁴¹ Die symptomatische Behandlung des erhöhten intrakraniellen Drucks wird unter anderem mit Osmodiuretika, Hyperventilation, Tris-Puffer und Hypothermie durchgeführt. Diese Therapiemöglichkeiten sind durch zahlreiche Nebenwirkungen limitiert und führen zumeist nur zu einer kurzfristigen Verbesserung der klinischen Situation.⁵ Einzig die operative dekompressive Hemikraniektomie gewährleistet eine dauerhafte Beherrschung der intrakraniellen Drucksituation. Dieses Behandlungsverfahren ist jedoch wegen seiner hohen Invasivität umstritten und kommt in den meisten Zentren daher derzeit lediglich in Einzelfällen als ultima ratio zum Einsatz.^{5,143}

Da die Pathophysiologie des Schlaganfalls über weite Bereiche noch unzureichend aufgeklärt ist und auch die Therapiemöglichkeiten begrenzt sind, wird der experimentellen Schlaganfallforschung ein hoher Stellenwert beigemessen. In der Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung des akuten Schlaganfalls

spielen tierexperimentelle Studien eine Schlüsselrolle und fungieren als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung.

Entscheidend ist dabei die möglichst wirklichkeitsnahe Simulation der klinischen Situation am Krankenbett. Tiermodelle zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien sollten daher die Erkrankung des Schlaganfallpatienten möglichst genau abbilden, um eine Übertragbarkeit der so gewonnenen Daten auf den Menschen zu gewährleisten.

2. Zielsetzung

Unter pharmakologischer Neuroprotektion versteht man eine Reihe erfolgversprechender Verfahren zur Begrenzung der Ausbreitung der ischämischen Schädigung in der Akutphase des Schlaganfalls. Zahlreiche Substanzen sind im Tiermodell nachweislich wirkungsvoll und führen dort zu einer Reduktion des Infarktolumens, zu einer Verbesserung des klinisch-funktionellen Outcomes und einer Reduktion der Mortalität. Allerdings sind alle bisher veröffentlichten klinischen Studien fehlgeschlagen, obwohl sich die entsprechenden Substanzen zuvor im Tiermodell als wirkungsvoll erwiesen haben.¹⁶⁴ Die möglichen Ursachen dafür sind vielfältig. Unter anderem wird von zahlreichen Autoren die mangelnde Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf den Menschen angeführt. Weitere Gründe liegen möglicherweise in der Wahl der Outcome-Parameter, der unzureichenden Power und anderer Schwachpunkte der Designs klinischer Studien (z.B. Zeitfenster für den Therapiebeginn).¹⁶⁴

In der vorliegenden Arbeit soll auf die Probleme der mangelnden Übertragbarkeit tierexperimenteller Schlaganfallstudien auf den Menschen eingegangen und eigene weiter entwickelte, optimierte Tiermodelle für Studien zur Neuroprotektion vorgestellt werden.

In der experimentellen Schlaganfallforschung sind Rattenmodelle weit verbreitet. Zum permanenten oder passageren Verschluss der A. cerebri media wird hier zumeist das so genannte Fadenmodell angewandt. Eine wesentliche Nebenwirkung dieses Modells liegt in der Induktion von Hypothalamusinfarkten. Eine Schädigung des Hypothalamus (bei Säugetieren und Menschen ein wesentliches Zentrum der Thermoregulation) kann zu einem pathologischen Anstieg der Körpertemperatur führen. Diese pathologische Hyperthermie kann Neuroprotektionsstudien negativ

beeinflussen oder verfälschen.^{94,106,171} Der Hypothalamusinfarkt mit der daraus resultierenden Hyperthermie tritt beim Menschen nicht auf und beeinträchtigt daher die Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen.

Zur Vermeidung dieser Nebenwirkungen wurde das so genannte Makrosphärenmodell entwickelt.⁵⁰ In der vorliegenden Arbeit soll dieses erstmals 2003 beschriebene Schlaganfallmodell weiter evaluiert werden. Konkret sollen dabei folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lassen sich mit dem Makrosphärenmodell typische Komplikationen des Fadenmodells vermeiden?
2. Ist die bei permanenten Verschlüssen der A. cerebri media zu beobachtende pathologische Hyperthermie tatsächlich eine Folge der Hypothalamusschädigung?
3. Beeinflusst die pathologische Hyperthermie tierexperimentelle Neuroprotektionsstudien?
4. Verbessert die Verwendung des Makrosphärenmodells die Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Erkenntnisse auf den Menschen?
5. Welche weiteren Vorteile und welche Nachteile hat das Makrosphärenmodell gegenüber den bisher eingesetzten Infarktmodellen?
6. Gibt es weitere Anwendungen für das Makrosphärenmodell?

II. Literaturübersicht

1. Einsatz von Nagern in der experimentellen

Schlaganfallforschung

Zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien stehen eine Reihe tierexperimenteller Modelle zur Verfügung. Obwohl auch höher entwickelte Spezies, wie Katze, Hund, Kaninchen oder Primaten für Schlaganfallmodelle eingesetzt werden, wird zumeist die Ratte oder auch die Wüstenrennmaus (Gerbil) als Versuchstier verwendet, da diese Tiere sowohl in der Anschaffung als auch in der Durchführung der Experimente kostengünstiger sind. Ein weiterer Vorteil, den diese Nagetiere aufweisen, ist die inzuchtbedingte hohe Homogenität innerhalb der einzelnen Stämme sowie die große Ähnlichkeit der zerebrovaskulären Anatomie und Physiologie zu höher entwickelten Spezies. Die geringe Größe des Gehirns ist ferner vorteilhaft für einige Fixationsverfahren, wie z.B. das freeze-trapping für biochemische Analysen in vivo. Ein weiterer Grund für die Verwendung von den kleinen Nagetieren ist die größere Akzeptanz gegenüber z.B. Primaten aus ökologischer und ethischer Perspektive.⁵⁶ In letzter Zeit erlangt auch die Maus mehr Aufmerksamkeit für die Verwendung in Schlaganfallmodellen, da sie leichter als transgenes Tier für knock-out-Experimente eingesetzt werden kann. Ein wesentlicher Nachteil von Maus- und Gerbil-Modellen ist das Fehlen der A. communicans posterior bei diesen Spezies.¹⁴⁸ Aus diesen Gründen wird in der Schlaganfallforschung vornehmlich die Ratte als Versuchstier eingesetzt.

Zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien stehen bei dieser Spezies eine Reihe von Techniken mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen zur Verfügung, die in Kap. II.5. ausführlich besprochen werden.

2. Vergleichende Anatomie des Gehirns von Ratte und Mensch

2.1. Allgemeine Anatomie

Im Gegensatz zum gyrencephalen Gehirn des Menschen, dessen Kortex zur Vergrößerung der Oberfläche zu Gyri und Sulci gefaltet ist¹⁵⁷, verfügt die Ratte über ein lissencephales Gehirn mit glatter Kortexoberfläche.¹⁴⁴

Während beim Menschen der Hirnstamm infolge der mächtigen Entfaltung des Großhirns und der aufrechten Körperhaltung zwischen Di- und Mesencephalon eine

nahezu rechtwinklige Knickung aus der Horizontalen in die Vertikale aufweist und das gesamte Rautenhirn von den beiden Großhirnhemisphären überlagert wird¹⁵⁷, bleibt der Truncus encephali bei der Ratte gestreckt. Die einzelnen Abschnitte liegen noch weitgehend in ursprünglicher Art und Weise hintereinander angeordnet der Schädelbasis auf.²⁰

Sowohl bei der Ratte als auch beim Mensch besteht das Gehirn aus zwei Hemisphären. Diese sind von rostral nach caudal durch die Fissura longitudinalis cerebri getrennt und im mittleren Bereich durch das Corpus callosum verbunden. An der Basis des Cerebrums befindet sich der Hypothalamus, der den Boden des dritten Ventrikel bildet.^{118,156}

2.2. Extrakranielle Gefäßversorgung

Beim Menschen und bei der Ratte gabelt sich die A. carotis communis in die A. carotis interna und A. carotis externa. Während die A. carotis interna beim Menschen ohne Äste abzugeben in den Canalis caroticus der Schädelbasis eintritt, gibt sie bei der Ratte die A. pterygopalatina ab. Dieses Gefäß entspricht der aus der A. carotis externa abgehenden A. maxillaris des Menschen.^{144,156}

Die A. carotis externa teilt sich beim Menschen und der Ratte unterschiedlich auf. Beim Menschen gibt sie zuerst die Aa. thyroidea superior, lingualis und facialis ab. Danach entspringt nach medial die A. pharyngea ascendens und nach dorsal die Aa. occipitalis und auricularis posterior.¹⁵⁶ Anschließend teilt sie sich in ihre beiden Endäste, die A. maxillaris und A. temporalis superficialis auf.

Bei der Ratte gibt die A. carotis externa zuerst die A. occipitalis ab und danach die Aa. thyroidea superior. Im Anschluss teilt sie sich in ihre Endäste A. maxillaris externa und A. lingualis auf.¹⁴⁴

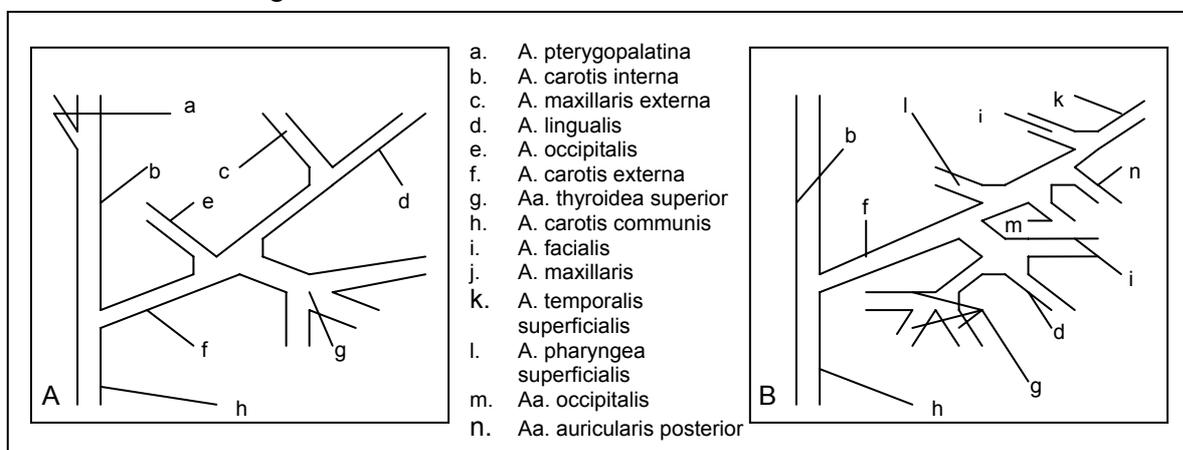


Abb. 1: Die extrazerebrale Gefäßversorgung der Ratte (A) und des Menschen (B)

2.3. Intrakranielle Gefäßversorgung

Die intrakranielle vaskuläre Anatomie sowie die Aufteilung der Gefäßterritorien sind bei Mensch und Ratte ähnlich. Bei beiden Spezies stellt die A. carotis interna das Hauptgefäß dar, welche als erstes die A. communicans posterior abgibt und sich weiter rostral in die A. cerebri media und die A. cerebri anterior aufteilt. Die A. basilaris entsteht beim Menschen wie bei der Ratte durch die Fusion beider Vertebralarterien. Sie verläuft über den ventralen Anteil des Hirnstammes und gibt die Aa. cerebri posteriores, die beidseits über die Aa. communicantes posterior mit den Aa. carotides internae verbunden sind ab. Ein Unterschied zwischen Ratte und Mensch besteht darin, dass sich bei der Ratte die Aa. cerebri anteriores der beiden Hemisphären zu einem einzigen Gefäß vereinigen, während sie beim Menschen getrennt nach rostral ziehen und durch die A. communicans anterior verbunden sind. Allerdings haben beide anatomische Varianten die gleiche funktionelle Bedeutung. Varianten des Circulus arteriosus cerebri treten sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte häufig auf (siehe Kapitel IV. 2. und 4.).^{45,144,156,157}

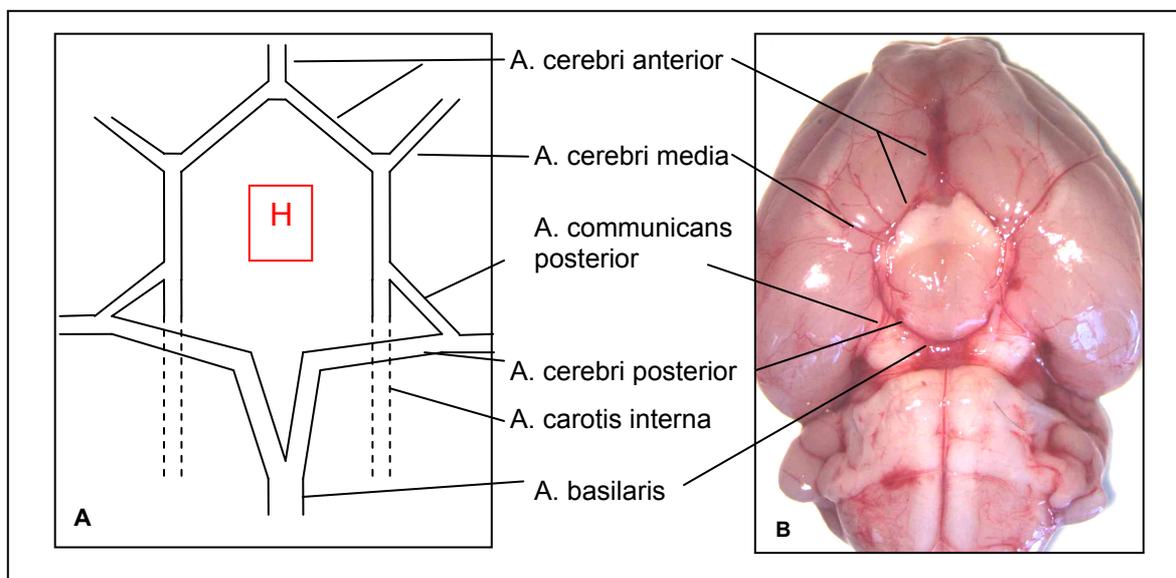


Abb.2: grobe intrazerebrale Gefäßanatomie (Circulus arteriosus cerebri) der Ratte als Schemazeichnung(A) und als Photo (B); H=Hypothalamusbereich und seine Gefäßversorgung

Bezüglich der arteriellen Gefäßversorgung des Hypothalamus bestehen zwischen Ratte und Mensch einige gravierende Unterschiede: Bei der Ratte wird der Hypothalamus hauptsächlich durch die A. hypothalamica versorgt, die aus der A. carotis interna entspringt. Ferner ist jeweils ein kleinerer Ast aus der A. cerebri anterior und A. communicans posterior an der Versorgung beteiligt.¹⁴⁴ Der Hypothalamus des Menschen hingegen wird durch einige kleinere Zweige direkt aus

der A. cerebri anterior und durch mehrere kleinere Arterien des intrakraniellen Abschnitts der A. carotis interna versorgt. Zusätzlich erhält der Hypothalamus des Menschen seine Blutzufuhr durch mehrere kleine Äste der A. communicans posterior und A. communicans anterior.³⁷

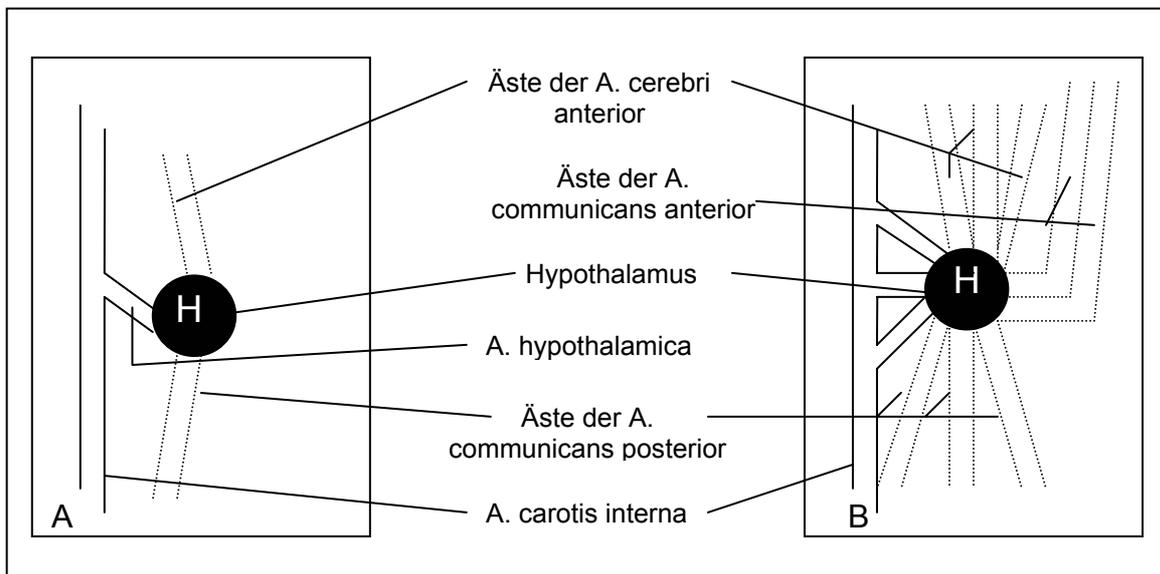


Abb.3: Gefäßversorgung des Hypothalamus bei der Ratte (A) und beim Menschen (B)

3. Pathophysiologie des Schlaganfalls

3.1. Das Penumbra-Konzept

Der ischämische Schlaganfall wird beim Menschen überwiegend durch kardiogene Embolien (z.B. bei Vorhofflimmern und Bildung intrakavitärer Thromben) oder durch arterio-arterielle Embolien (z.B. ausgehend von atherosklerotisch bedingten Stenosen hirnersorgender Arterien) ausgelöst. Im Gegensatz zu globalen Ischämien, bei denen die gesamte Blutzufuhr des Gehirns unterbrochen ist (z.B. beim Herzstillstand), kommt es bei einem embolischen Verschluss einer einzelnen Hirnarterie nur in einem Teilbereich des betroffenen Gewebes zu einer verminderten Durchblutung. Die Nervenzellen im praktisch nicht perfundierten Infarktkern sind nach wenigen Minuten unwiederbringlich geschädigt und damit einer Behandlung kaum zugänglich. Die Randbereiche des betroffenen Gewebes werden jedoch in unterschiedlichem Ausmaß durch benachbarte Hirnarterien durchblutet und unterliegen somit lediglich einer Unterversorgung. Die Nervenzellen dieser Randzone metabolisieren noch in geringem Umfang Glukose. Die in diesem Areal aktiv ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge führen im Laufe einiger Stunden zu einem sukzessiven Absterben der Nervenzellen – es kommt zu einer weiteren

Ausbreitung der Infarktzone. Tierexperimentelle und einzelne klinische Studien deuten darauf hin, dass etwa 50 bis 70% des minderperfundierten Hirnvolumens in den ersten Minuten irreversibel geschädigt werden. Die verbleibenden etwa 30 bis 50% (die Penumbra) gehen in den folgenden 3 bis 6 Stunden zu Grunde und sind somit innerhalb dieses engen Zeitfensters therapeutischen Interventionen zugänglich.^{19,66,96}

Für diese -messtechnisch schwer fassbare- Randzone um das ischämische Hirnareal wurde von Astrup et al⁴ der Begriff „Penumbra“ (wörtlich: „Halbschatten“) eingeführt. Als „Penumbra“ wird das zwischen dem nicht perfundiertem Kerngebiet und normal perfundiertem Gewebe liegende Areal definiert. Im Bereich der Penumbra ist der Funktionsstoffwechsel weitgehend erloschen, allerdings ist der Strukturstoffwechsel noch vorübergehend erhalten. Dieses Gewebe (auch „tissue at risk“ genannt) kann durch eine Wiederherstellung der Perfusion oder durch andere neuroprotektive Maßnahmen vor dem nekrotischen Zelluntergang bewahrt werden.⁴

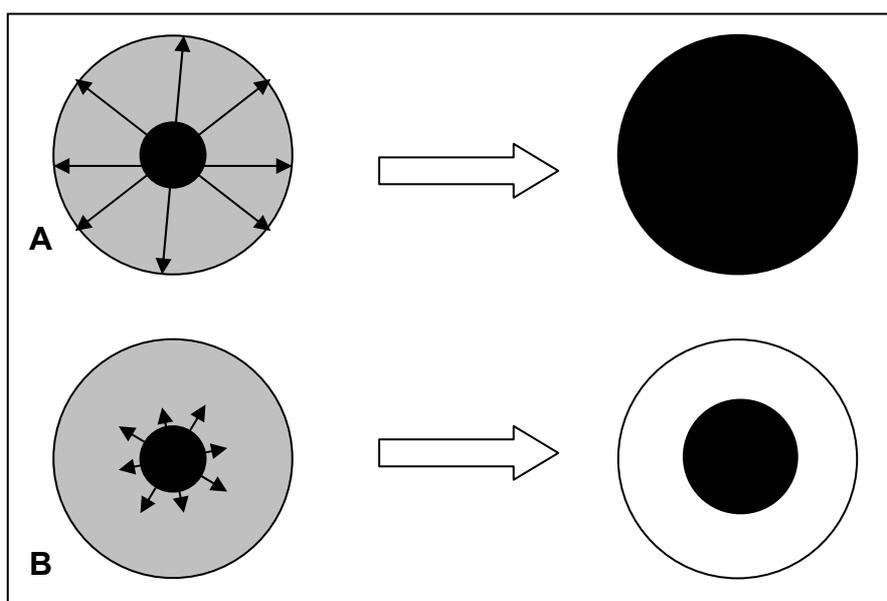


Abb.4:
Penumbra-Konzept:
Ohne eine Intervention kommt es zu einer Ausbreitung des Infarktes (A). Durch eine Reperfusion oder eine andere neuroprotektive Behandlung ist es theoretisch möglich, die Ausbreitung des Infarktes zu verhindern bzw. zu minimieren und so einen Teil der Penumbra als intaktes Gewebe (weiß) zu erhalten (B).¹⁹
Grau: „Penumbra“
Schwarz: Nekrose

3.2. Die postischämische Kaskade

Mehrere Mechanismen führen während der fokalen zerebralen Ischämie zum Zelluntergang: Exzitotoxizität, die Freisetzung freier Radikale, Inflammation und apoptotischer Zelltod. Diese Mechanismen laufen überwiegend zeitlich gestaffelt ab, überlappen sich aber auch teilweise und werden in ihrer Gesamtheit als „postischämische Kaskade“ bezeichnet.⁹⁶

aktiviert werden und so kationspezifische Kanäle öffnen können. Zu Ihnen zählen der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor, der AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure)-Rezeptor und der Kainat-Rezeptor.¹¹¹ Die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) sind an das G-Protein gekoppelt und beeinflussen so verschiedene intrazelluläre Prozesse. Inzwischen sind acht Mitglieder der mGluR-Familie bekannt, die sich in drei Subfamilien aufteilen lassen. Die erste Gruppe (mGluR1 und mGluR5) bewirkt über die Aktivierung der Phospholipase C und des Inositoltriphosphat/Diacylglycerol-Systems die Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Die mGluR der zweiten (mGluR2, 3) und der dritten Gruppe (mGluR4, 6, 7, 8) kommen häufig präsynaptisch vor und modulieren die synaptische Übertragung durch die Hemmung der Adenylatzyklase. Außerdem modulieren mGluR gemeinsam mit entsprechenden G-Proteinen direkt Ionenkanäle in der prä- und postsynaptischen Membran (K^+ -Kanäle, Ca^{2+} -Kanäle und ionotrope Glutamatrezeptoren). Aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften sind mGluR an der Modulation synaptischer Übertragung und an der Induktion synaptischer Plastizität beteiligt.¹⁸

An der oben beschriebenen Glutamathypothese wurden in jüngster Zeit Zweifel geäußert. So soll nicht nur die kurzfristige Glutamaterhöhung für die anhaltende Öffnung des Glutamatrezeptors verantwortlich sein, sondern auch die sog. Perinfarktdepolarisation, die anhaltende Verstärkung der synaptischen Effektivität oder ein Defekt des Magnesiumblocks des NMDA-Rezeptors.^{74,119}

Die Perinfarktdepolarisation ist ein Prozess repetitiver Depolarisationen. Ischämische Neurone und Gliazellen depolarisieren durch den Mangel an Energie und durch die Freisetzung von Kaliumionen und Glutamat. Im Kernbereich des geschädigten Hirngewebes werden die Zellen depolarisiert, aber nie repolarisiert. Im Bereich der Penumbra können die Zellen nur durch einen weiteren Energieverbrauch repolarisieren. Die gleichen Zellen können dann wieder als Antwort auf den Glutamat- und / oder Kaliumanstieg depolarisieren, wobei Glutamat und Kalium im Extrazellulärraum kumulieren. Die folgenden repetitiven Depolarisationen werden Perinfarktdepolarisationen genannt. Gesundes kortikales Gewebe ist in der Lage die resultierenden gesteigerten Anforderungen an den Energiestoffwechsel ohne permanente Schäden zu kompensieren.^{39,133} Auch die so genannte „Spreading Depression“ (stark gesteigerte Neuronenaktivität auf bis zu 300%) wird vom gesunden Hirngewebe gut verkraftet. Die perifokale postischämische „Spreading

Depression“ tritt in sehr unterschiedlichen Intervallen in der ipsilateralen Hemisphäre auf und führt zu einer erhöhten Glukoseumsetzung, also einer metabolischen Aktivität.^{7,66} Ist die Spreading Depression noch durch eine adäquate, begleitende Durchblutungssteigerung analog zu dem erhöhten Metabolismus gekennzeichnet, verlaufen Periinfarktdepolarisationen ohne hämodynamische Kompensation. Aufgrund des erhöhten Sauerstoffbedarfs können Periinfarktdepolarisationen bei gleich bleibendem Angebot zur Zunahme des Infarktvolumens, d.h. dem Übergang des Gewebes vom Status der Penumbra zum irreversibel geschädigten Infarktgewebe, führen, da die minderperfundierten Zellen der Penumbra nicht mehr in der Lage sind, die für die Depolarisationen notwendige Energie vorzuhalten.^{7,66} Die Wiederherstellung des Ionengleichgewichts kann nicht durch eine Zunahme des zerebralen Blutflusses gedeckt werden. Daher ist die Grenze der metabolischen Kompensationsfähigkeit in der Penumbra rasch überschritten. Da die Zunahme der Sauerstoffausschöpfung unzureichend ist, kann der Gewebeuntergang der Penumbra nicht verhindert werden.^{39,133}

Diese Depolarisation konnte mit Hilfe von elektrophysiologischen und kernspintomographischen Methoden nach Verschluss der A. cerebri media direkt im Tiermodell nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der Periinfarktdepolarisationen und der Infarktgröße. Außerdem führt eine pharmakologische Reduktion der Periinfarktdepolarisation zu einer deutlichen Neuroprotektion.⁶⁷ Mehrere tierexperimentelle Beobachtungen unterstützen die These, dass die Periinfarktdepolarisation einen wichtigen Mechanismus der ischämischen Zellschädigung darstellt, allerdings gelang bisher noch kein direkter Nachweis beim Menschen. Derzeit bleibt deshalb die Bedeutung der Spreading Depression und Periinfarktdepolarisation für die klinische Situation des Hirninfarktes noch unklar.^{6,66,133}

Durch das Versagen der Natrium-Kalium-Pumpe und die Stimulation der Glutamaterezeptoren kommt es zu einer Depolarisation der Neurone. Dies führt zu einem Kalziumeinstrom über spannungsabhängige und rezeptorgebundene Kalziumkanäle. Kalzium kann jedoch aufgrund des Energiemangels nicht hinreichend aus der Zelle heraustransportiert werden.¹⁴⁶ Außerdem wird zusätzlich Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Dadurch lässt sich im Rahmen zerebraler Ischämien in den Neuronen ein erhöhter intrazellulärer Kalziumgehalt nachweisen.¹³⁷ Diese Erhöhung des intrazellulären Kalziums führt zu einer Aktivierung

unterschiedlicher Enzyme, wie Proteasen, Phospholipasen, Endonukleasen oder NO-Synthasen. Diese Enzyme bewirken wiederum Schädigungen der Zellmembran, des Zellkerns oder anderer Organellen.¹⁴⁶

Die überhöhte Stimulation der prä- und postsynaptischen Glutamatrezeptoren bewirkt einen dramatischen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche ihrerseits zu einer verstärkten Glutamatfreisetzung führt. Diese zwei Prozesse der Exzitotoxizität verstärken sich gegenseitig und kennzeichnen die wesentlichen Pathomechanismen in der Frühphase der postischämischen Kaskade.

3.2.2. Freie Radikale

Unter freien Radikalen versteht man Atome, Moleküle oder Ionen, die ein oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen besitzen. Ein ungepaartes Elektronenpaar belegt dabei ein Orbital allein. Manche Radikale sind stabil und langlebig wie z.B. Sauerstoffradikale, die meisten jedoch sind extrem reaktiv und instabil und können zu Schädigungen von Makromolekülen führen.

Freie Radikale werden unter normalen metabolischen Bedingungen nur in geringem Umfang gebildet. Im Verlauf der postischämischen Kaskade führt die Aktivierung von Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen zu einer gesteigerten Freisetzung freier Radikale. Die Zellen besitzen zur Abwehr dieser toxischen Radikale verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen: Zu den enzymatischen Mechanismen zählt die Neutralisierung des Superoxid-Anionenradikals durch Superoxid-Dismutasen, Katalasen und / oder Glutathion-Peroxidasen. Die nicht-enzymatischen Mechanismen beruhen u.a. auf α -Tocopherol und β -Carotin, welche die Radikalkette unterbrechen, Ascorbat und Glutathion, welche verschiedene antioxidative Funktionen erfüllen, und Harnsäure, welche als Radikalfänger funktioniert.⁹⁷ Die Bildung und Elimination freier Radikale liegen unter physiologischen Bedingungen in einem ausgewogenen Gleichgewicht. Unter den Bedingungen einer zerebralen Ischämie, insbesondere wenn es durch eine Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes zu einer Reperfusion kommt, steigt die Konzentration freier Radikale im Gewebe drastisch an.^{112,125} Die Überlastung der endogenen sowie das Versagen energieabhängiger Abwehrmechanismen unter ischämischen Bedingungen lassen die Konzentration freier Radikale im betroffenen Gewebe weiter ansteigen.¹³⁹ Das Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und endogenen Abwehrmechanismen verschiebt sich durch die Ischämie zugunsten der

freien Radikale. Diese Radikale führen dann zur direkten Schädigung von Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, DNA und zur Lipidperoxidation, wodurch letztlich die Zellmembran geschädigt und die Apoptose bzw. Nekrose eingeleitet wird.^{96,146}

3.2.3. Inflammation

Im weiteren Ablauf der postischämischen Kaskade reagiert das Gehirn auf die Ischämie mit einer Entzündungsreaktion, die wenige Stunden nach Ischämiebeginn einsetzt und über Tage bis Wochen anhält.³ Zunächst ist ein deutlicher Anstieg der Leukozytenzahl in den Kapillaren zu verzeichnen.⁶⁵ Diese Akkumulation von Leukozyten in den kleinen Gefäßen scheint im Falle einer Reperfusion die mögliche Ursache für einen herabgesetzten lokalen Blutfluss zu sein, der auch als „no-reflow-Phänomen“ bezeichnet wird.⁶¹ Die Leukozyten können mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen durch die Kapillaren in das Hirngewebe einwandern.⁵⁹ Ferner aktivieren die durch die Ischämie freigesetzten Zytokine die im ZNS residenten Mikroglia und Astrozyten.³ Sowohl die eingewanderten Leukozyten als auch die aktivierten Gliazellen können potentiell zytotoxische Substanzen synthetisieren und freisetzen. Ein deutlicher Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α zeigt sich bereits wenige Stunden nach Ischämiebeginn.¹³⁶ Diese Zytokine können über eine weitere Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, über die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und über die Verstärkung der Produktion freier Radikale zum ischämischen Zellschaden beitragen.^{88,128} Allerdings können IL-1 β und TNF- α auch potentiell neuroprotektive Effekte entfalten, beispielsweise durch die Aktivierung des Nerve Growth Factor (NGF), einem Wachstumsfaktor, oder durch die Verstärkung der GABAergen Hemmung.^{8,42,149}

Ein weiteres potentiell zytotoxisches Molekül ist Stickstoffmonoxid (NO). Dieses Molekül wird von aktivierten Entzündungszellen gebildet und anschließend freigesetzt. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) ist eine Isoform der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), die im gesunden Gewebe nicht vorhanden ist und unter pathologischen Bedingungen, vor allem von Makrophagen und Mikroglia, aber auch von Neuronen und Astrozyten exprimiert wird.¹¹⁶

Die Stickstoffmonoxidsynthase führt zu der Produktion toxischer Mengen von Stickstoff. Stickstoff wirkt als Vasodilator und verstärkt als Transmitter den exzitatorischen Einfluss von Glutamat.⁶⁶

Der Anstieg der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase ist zwölf Stunden nach Beginn der Ischämie nachzuweisen und erreicht nach 48h das Maximum. Innerhalb der nächsten sieben Tage kommt es zu einer Normalisierung.⁷⁷ Ein schädigender Einfluss der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase lässt sich anhand von Knockout-Mäusen, denen das Gen für diese Synthase fehlt, nachweisen. Bei diesen Tieren treten kleinere Infarkte auf als bei den Wildtypmäusen.⁷⁶

3.2.4. Apoptose

In der Spätphase der postischämischen Kaskade („down-stream“) stehen apoptotische Vorgänge im Vordergrund des Zelluntergangs. Die Apoptose bezeichnet den so genannten „programmierten Zelltod“. Dieser Vorgang wird bei Neuronen aktiviert, die keinen synaptischen Kontakt zu anderen Zellen aufbauen können. Dies ermöglicht ein kontrolliertes Absterben dieser überflüssigen Zellen ohne die Nachbarzellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Dabei initiieren die Zellen durch eine Aktivierung endogener Proteasen (Caspase) ihren eigenen programmierten Zelltod. Dies führt zu einer Auflösung des Zellkerns und einer Spaltung der DNA in charakteristische Bestandteile.¹²⁴ Während der Apoptose bleibt die Zellmembran relativ lange intakt, so dass initial keine für die Umgebung toxischen zytoplasmatischen Komponenten austreten können.⁷¹ Unter physiologischen Bedingungen läuft der Vorgang z.B. während der Embryonalentwicklung des Gehirns, in Keimzentren von Lymphknoten sowie bei zellulärem Turn-over und Involutionsprozessen ab. Die gleichen Mechanismen laufen aber auch unter pathologischen Bedingungen ab. Hierzu zählen akute und chronische Erkrankungen des zentralen Nervensystems (zerebrale Ischämien, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Trauma, zerebrale Krampfanfälle, Reperfusionsschäden), des Herzens (myokardiale Ischämie), der Leber und anderer Organe, die in unterschiedlichem Ausmaß pathophysiologisch relevant sind. Ferner tritt die Apoptose bei malignen Erkrankungen (follikuläre Lymphome, Karzinome mit Mutationen von p53, hormonabhängige Tumore), Autoimmunerkrankungen (systemischer Lupus erythematodes, autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom, Immun-medierte Glomerulonephritis), viralen Infektionen und AIDS auf.

Bei der zerebralen Ischämie konnte mit Hilfe von Tiermodellen gezeigt werden, dass ein erheblicher Teil der Neurone durch Apoptose und nicht durch Nekrose untergeht.⁹⁵

4. Der NMDA-Rezeptor und die NMDA-Antagonisten

Die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität spielt in der Frühphase der postischämischen Kaskade eine zentrale Rolle und kann als Ansatzpunkt für neuroprotektive Therapiestrategien dienen. Der Neurotransmitter Glutamat bindet hauptsächlich an vier Rezeptortypen: NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-, AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat)-, Kainat- und verschiedene metabotrope Glutamat-Rezeptoren. Dabei zählen die drei erst genannten Rezeptoren zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Der NMDA-Rezeptor verfügt über eine komplexe Struktur mit Bindungsstellen für bivalente Kationen, Polyamine und Glycin, aber auch über Ligandenbindungsstellen. Glutamat fungiert als Haupt-Agonist, Glycin und Polyamide als Co-Agonisten des NMDA-Rezeptor-Komplexes. Antagonisten-Bindungen können an allen Bindungsstellen eingegangen werden.⁸²

Die Funktionsweise des NMDA-Rezeptor-Komplexes ist gut untersucht. Sein Ionenkanal ist unter den Bedingungen des Ruhepotentials bei etwa -70 mV durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Erst wenn zwei Bedingungen erfüllt sind (=Koinzidenz-Detektor), wird dieser Magnesiumblock aufgehoben: Der Rezeptor muss durch Liganden aktiviert werden und das Neuron muss depolarisiert sein. Von Bedeutung ist, dass auch schon bei einer leichten Depolarisation der Zellmembran auf etwa -50 mV die Magnesiumblockade des Ionenkanals gelöst wird.^{18,111,152}

Die Glutamatkonzentration beträgt im synaptischen Spalt etwa 0,6 μ M/l. Bei synaptischer Aktivität steigt die Konzentration für 1-2 ms auf etwa 1mM/l an. Gleichzeitig kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran. Magnesium verlässt aufgrund seiner Bindungseigenschaften und Spannungsabhängigkeit den NMDA-Rezeptor. Neben Kalzium-Ionen strömen auch Natrium-Ionen in die Zelle ein.^{18,111}

Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei der Demenz vom Alzheimer-Typ, wo Glutamatrezeptoren zugrunde gehen, oder der Exzitotoxizität bei zerebralen Ischämien, erfolgt die Glutamatfreisetzung und -aufnahme weniger kontrolliert. Die Glutamatkonzentration steigt zwar nur geringfügig (bis 100 SI-Einheiten), aber über einen lang anhaltenden Zeitraum (bis zu mehreren Stunden) an. Diese pathologische, unterschwellig erhöhte Glutamatkonzentration reicht aus, um den Magnesiumblock im NMDA-Rezeptor aufzuheben. Kalzium-Ionen strömen dadurch kontinuierlich in die Zelle ein, was zu einer ständigen Reizbildung und zu einer Vergrößerung des Kalzium-Pools führt. Auf neuronaler Ebene wirkt der übermäßige Kalzium-Einstrom zellzerstörend.^{18,111}

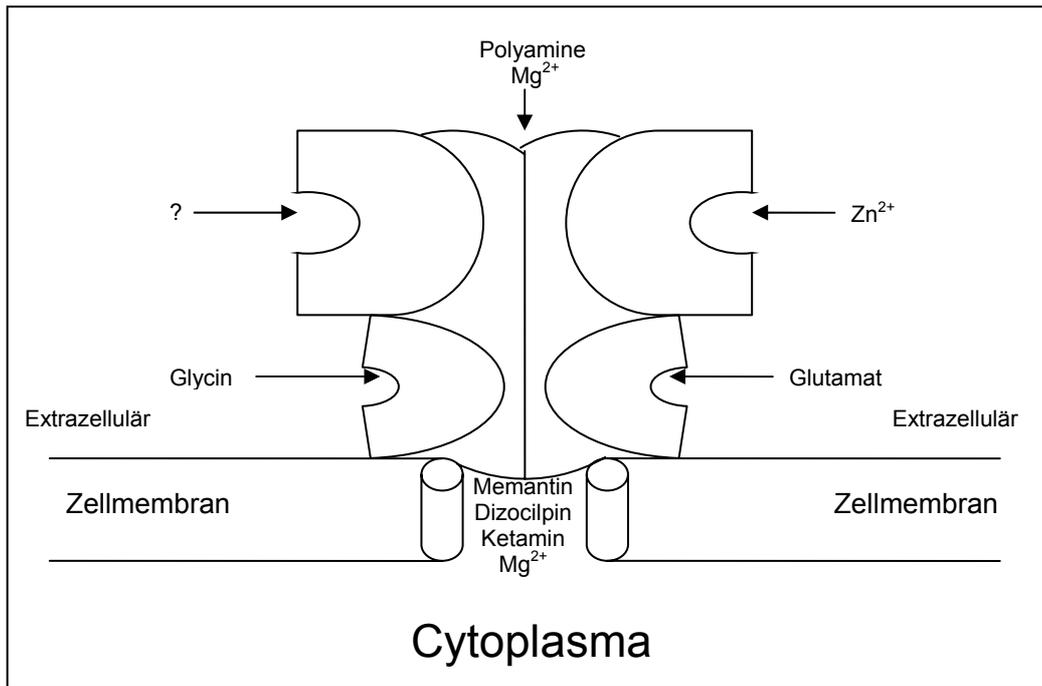


Abb.6: Schematische Zeichnung des NMDA-Rezeptors mit seinen Bindungsstellen

Eine Reihe von bereits im klinischen Einsatz befindlichen Medikamenten wirken über Bindungen an den NMDA-Rezeptor-Komplex, wie z.B. Ketamin (ein Kurzzeitnarkotikum), Amantadin (Parkinsonmedikament, Virustatikum) und Memantin (Antidementivum).¹⁵² Pharmakologisch kann der NMDA-Rezeptor durch kompetitive und nicht-kompetitive Antagonisten beeinflusst werden. Die kompetitiven Antagonisten konkurrieren direkt mit dem Glutamat. Sie haben eine hohe Spezifität und Wirksamkeit, können die Blut-Hirn-Schranke allerdings in der Regel nur schlecht passieren. Die nicht-kompetitiven Antagonisten blockieren den Ionenkanal des NMDA-Rezeptors und verhindern so den Ca^{2+} -Einstrom. Diese Antagonisten können die Blut-Hirn-Schranke in der Regel leicht passieren. Zu den nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten zählen beispielsweise Dizocilpin (MK-801), Selfotel (CGS19755), Cerestat (Aptiganel) und Dextrometorphan (Romilar). Der klinische Einsatz dieser Substanzen ist jedoch teilweise durch schwerwiegende Nebenwirkungen limitiert. So können sie bereits in niedrigen Dosen zu dysphorischen Zuständen führen und die Wahrnehmung und Vigilanz herabsetzen. Auch blutdrucksenkende Nebenwirkungen wurden beschrieben. In höheren Dosierungen können schwerwiegende psychiatrische Nebenwirkungen mit Halluzinationen und Erregungszustände auftreten.⁴⁹ Als ein besser verträglicher und klinisch einsetzbarer NMDA-Antagonist ist z.B. Memantin zu nennen. Es blockiert als nicht-kompetitiver NMDA-Antagonist den Rezeptor-Kanal, hat aber im Gegensatz zu den zuvor genannten NMDA-

Antagonisten kaum Nebenwirkungen. Memantin wirkt wie das physiologische Magnesium, ist jedoch darüber hinaus in der Lage den NMDA-Rezeptor auch in Gegenwart einer pathologisch anhaltenden Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt zu blockieren und das postsynaptische Neuron vor dem Glutamat-vermittelten Kalzium-Einstrom zu schützen (neuroprotektiver Effekt). Bei einer hohen Freisetzung von Glutamat, d.h. beim Eintreffen eines physiologischen Signals, verlässt Memantin aufgrund seiner Spannungsabhängigkeit und schnellen Rezeptorkinetik kurzfristig den NMDA-Rezeptor. Memantin vermindert somit das erhöhte synaptische Rauschen und ermöglicht gleichzeitig, dass relevante physiologische Signale erkannt werden.^{109,111}

Dizocilpin ist ebenfalls ein nicht-kompetitiver NMDA-Antagonist, der den Rezeptorkanal blockiert. Im Gegensatz zu Memantin blockiert Dizocilpin nicht nur die pathologische, sondern auch die physiologische Aktivierung des NMDA-Rezeptors, da seine Spannungsabhängigkeit weniger ausgeprägt ist, er unter physiologischen Bedingungen langsamer die Blockade des Kanals auflöst als Magnesium und es ihm unmöglich ist, den Kanal innerhalb der Zeit einer normalen NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitation nach dem synaptischen Potential zu verlassen.¹¹¹ Dadurch treten die zuvor erwähnten Nebenwirkungen auf. Dizocilpin ist eine seit Jahren bekannte Substanz, die vielfach getestet und gut untersucht ist. So wurde beispielsweise gezeigt, dass dieser NMDA-Antagonist bei transienten globalen zerebralen Ischämien am Gerbil vor einer hippocampalen Neurodegeneration schützt.⁵⁵ Bei globalen Ischämien an der Ratte konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.²² Dagegen wurde in anderen Studien nachgewiesen, dass Dizocilpin seinen neuroprotektiven Effekt vorwiegend in transienten Fadenokklusionsmodellen der A. cerebri media entfaltet. Dabei wurde je nach Studiendesign eine Infarktreaktion zwischen 20 und 70% beobachtet.^{24,31,35,166} In den meisten Studien, in denen eine permanente Gefäßokklusion durchgeführt wurde, konnte kein signifikanter Effekt gezeigt werden.^{24,79,101,104,167}

Bei Untersuchungen zu fokalen zerebralen Ischämien konnte gezeigt werden, dass der neuroprotektive Effekt von Dizocilpin von der Körpertemperatur der Versuchstiere abhängt, da bei einer Hyperthermie kein signifikanter neuroprotektiver Effekt festzustellen ist.¹⁰⁶ Andere Studien weisen darauf hin, dass Dizocilpin eine Hypothermie verursacht und dadurch den neuroprotektiven Effekt erzielt.^{23,29}

5. Techniken zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte

Zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte werden zahlreiche unterschiedliche Operationstechniken verwendet. Grundsätzlich lassen sich endovaskuläre und nicht-endovaskuläre Verfahren unterscheiden.

5.1. Endovaskuläre Modelle

5.1.1. Das Fadenmodell

Das Fadenmodell wurde erstmals 1986 von Koizumi et al⁸⁵ beschrieben. Es ist das meistverwendete Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie fokaler zerebraler Ischämien und zur Evaluation neuer Therapieverfahren und kann sowohl zur Induktion von permanenten als auch von transienten Gefäßverschlüssen (Ischämie-Reperfusion) eingesetzt werden. Dieses Modell wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen modifiziert.^{12,87,98,103,115,121,159}

Bei diesem Verfahren wird durch eine Arteriotomie der A. carotis communis ein Nylonfilament anterograd bis zum Abgang der A. cerebri media eingeführt, was zu gut reproduzierbaren Infarkten im Versorgungsgebiet dieses Gefäßes führt.^{85,153}

Das Modell ist leicht anwendbar, verhältnismäßig wenig invasiv und gut reproduzierbar.

Eine wesentliche Nebenwirkung dieser Technik beruht auf der Verlegung der A. hypothalamica, die aus der distalen A. carotis interna entspringt. Die resultierende Infarzierung des Hypothalamus führt innerhalb weniger Minuten zu einer schwerwiegenden Störung der Temperaturregulation, die mit einem Anstieg der Körpertemperatur bis über 40°C verbunden ist. Diese pathologische Hyperthermie, die bei Menschen nicht zu beobachten ist, führt zu einer Aggravation der ischämischen Läsionen und kann nachweislich die Wirksamkeit neuroprotektiver Substanzen beeinträchtigen.^{94,106,171} Diese Nebenwirkung kann ausbleiben, wenn das Fadenokklusionsmodell zur Induktion transienter Ischämien eingesetzt wird. Dabei wird der Faden zu einem definierten Zeitpunkt zurückgezogen und so eine Reperfusion ermöglicht. Liegt dieser Zeitpunkt unter 90 Minuten kommt es zu einer vollständigen Erholung des Hypothalamus. Eine Hyperthermie tritt nicht auf.

Weitere Komplikationen, die bei der Verwendung dieses Modells vorkommen können, liegen in dem unvollständigen Verschluss der A. cerebri media (durch eine

unzureichende Einführungstiefe des Fadens)^{81,89,115}, in der Induktion subarachnoidaler Blutungen (durch Gefäßperforationen)^{87,89,98} und in der mechanischen Schädigung des Endothels, die theoretisch zur Bildung intraluminaler Thromben führen kann.^{85,105,129} Ferner kann es durch eine Dislokation des Fadens zu unerwünschten, vorzeitigen Reperfusionen kommen, was bei bis zu 25% der Experimente auftreten soll.¹⁴²

Das Fadenokklusionsmodell wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als so genanntes In-bore-Modell eingesetzt. Dies bedeutet, dass durch eine geringfügige Abwandlung der Technik die Infarktinduktion innerhalb des Kernspintomographen durchgeführt werden kann, was u.a. MR-tomographische Untersuchungen in der hyperakuten Phase der Ischämie (z.B. in den ersten Minuten nach Verschluss der A. cerebri media) und den direkten Vergleich prä- und postischämischer MR-Tomogramme ermöglicht.^{67,84,92,134,135} Der Einsatz des Fadenmodells zur In-bore Okklusion ist jedoch extrem schwierig und mit einer hohen Fehlerrate behaftet. Dieses Modell wird ausführlich in Kapitel III.1.3.1. dargestellt.

5.1.2. Makrosphärenmodell

Dieses Modell wurde 2003 erstmals von Gerriets et al⁵⁰ beschrieben.

Bei diesem Modell wird durch eine Arteriotomie der A. carotis externa ein Katheter eingeführt. Über diesen Katheter werden 6 Keramikugeln mit einem Durchmesser von 315-355 µm eingespült, die die basalen Hirnarterien an vorhersagbarer Stelle mechanisch verlegen.⁵⁰ Durch die Lage der Makrosphären wird der Blutfluss zur A. cerebri media verhindert. Dies führt zu gut reproduzierbaren Infarkten im Versorgungsgebiet der A. cerebri media.

Im Gegensatz zum Fadenmodell führt dieses Modell nicht zu einer Infarzierung des Hypothalamus, da die Kugeln distal der A. hypothalamica lokalisiert sind und so die Perfusion des Hypothalamus nicht beeinträchtigen. Die so behandelten Tiere bleiben normotherm. Der wesentliche Nachteil dieser Technik besteht darin, dass es sich ausschließlich zur Induktion permanenter Gefäßverschlüsse eignet und nicht als Reperusionsmodell eingesetzt werden kann.⁵⁰

Dieses Modell wird ausführlich in Kapitel III.1.3.2. dargestellt.

5.1.3. Mikrosphärenmodell

Das Mikrosphärenmodell wurde zum ersten Mal von Kogure et al.⁸³ im Jahre 1974 beschrieben.

Bei dieser Technik wird durch eine Arteriotomie der A. carotis externa ein Katheter retrograd in die A. carotis interna eingeführt, wobei die A. pterygopalatina zuvor ligiert wird. Den Tieren werden über den so eingebrachten Katheter, je nach Variante des Modells, 500-2000 Mikrosphären mit einem Durchmesser von 35 bis 50µm in die A. carotis interna eingespült. Dieser Mikrosphäreninjektion folgt eine Injektion mit 0,1 ml Kochsalzlösung.^{83,120}

Der Vorteil dieses Modells liegt in seiner sehr einfachen Handhabbarkeit und seiner hohen Erfolgsrate.¹⁶⁰ Diese Technik basiert auf einer embolischen Verlegung der Mikrozirkulation. Damit unterscheidet es sich erheblich von der Pathophysiologie des menschlichen Schlaganfalls, der in der Regel auf der Verlegung einzelner großer Hirnarterien beruht.^{73,160}

5.1.4. Thromboembolie-Modell

Die Erstbeschreiber des Thromboembolie-Modells waren Kudo et al. Zwischenzeitlich existieren von diesem Modell zahlreiche Varianten.^{26,80,86,123,161,169,170}

Dieses Modell simuliert die Situation der Schlaganfallpatienten sehr genau, da zur Okklusion der Hirnarterie statt artifizieller Materialien autologe Thromben verwendet werden. Daher erlaubt dieses Modell auch die präklinische Testung thrombolytischer Substanzen, wie z.B. rt-PA.²⁶

Die Herstellung und Zusammensetzung der Thromben variiert in der einschlägigen Literatur stark. Zumeist wird autologes (seltener heterologes) Blut verwendet, das teils durch Zugabe von Thrombin, teils auf anderem Wege zur Gerinnung gebracht wird. Zahlreiche Autoren verwenden Vollblut, einige nur Blutbestandteile. Die so präparierten Thromben werden dann durch eine Arteriotomie der A. carotis communis oder externa über einen Katheter injiziert.^{80,86}

Die Domäne dieser Technik liegt in der Testung thrombolytische Substanzen. Nachteilig wirkt sich die schwer kalkulierbare Spontanlyserate aus, die u.a. zu einer erhöhten Standardabweichung der Infarktgrößen führt. Ferner kann dieses Modell - ebenso wie die Fadenokklusionstechnik- zu Verschlüssen der A. hypothalamica mit einer resultierenden pathologischen Hyperthermie führen.^{73,100,164}

5.1.5. Arachidonat-induziertes-Thrombose-Modell

Dieses Mikroembolisationsmodell wurde 1975 von Furlow und Bass eingeführt.⁴⁸

Bei diesem Modell werden die A. carotis communis und die A. carotis externa dargestellt und die Äste der A. carotis externa und A. carotis interna ligiert. Durch eine Arteriotomie wird ein Polyethylenkatheter via A. carotis communis in die A. carotis interna eingeführt. Über den so implantierten Katheter wird eine Arachidonat-Lösung injiziert, was zu einer lokalen Thrombose führt.⁴⁸

Dieses Modell gelangt aufgrund der unphysiologischen Vorgehensweise (intraarterielle Injektion von Arachidonat in die hirnversorgenden Arterien) gegenwärtig kaum zur Anwendung.^{73,160}

5.2. Nicht-Endovaskuläre Modelle

Bei der Anwendung der meisten nicht-endovaskulären Modelle wird eine Kraniotomie durchgeführt. Diese Techniken sind im Vergleich zu den endovaskulären Modellen grundsätzlich invasiver und beeinflussen wegen der Eröffnung der Schädelkalotte den intrakraniellen Druck, die Blut-Hirn-Schranke und die lokale Gehirntemperatur.²⁸

Ein weiterer Nachteil aller nicht-endovaskulären Modelle liegt in der Möglichkeit der Verletzung der Kortexoberfläche und den bei Eröffnung der Dura mater nicht zu vermeidenden geringen subarachnoidalen Blutungen.⁶²

5.2.1. Photothrombosemodell

Dieses Modell wurde zuerst von Watson et al¹⁶² 1985 beschrieben.

Die Tiere werden zunächst in einem Stereotaxiegerät platziert. Es folgt eine Mittellinieninzision der dorsalen Kopfhaut auf einer Länge von ca. 1,5cm. Im Anschluss wird ein Katheter in die V. femoralis eingeführt und Bengale Rose-Lösung (typischerweise 20mg/kg) Minuten infundiert. Danach wird die A. cerebri media für etwa 20 Minuten mit einer faseroptischen Lichtquelle mit einer Intensität von 560nm bestrahlt. Durch diese Bestrahlung kommt es zu einer photochemischen Reaktion mit dem intravaskulären Bengale Rose, die zu einer lokalen Thrombose führt. Der resultierende Gefäßverschluss führt zu gut reproduzierbaren Hirninfarkten.¹⁶²

Von diesem Modell existieren zahlreiche Modifikationen.^{32,62,102,127,162,163,168}

Neben den üblichen aus der Kraniotomie resultierenden Nachteilen wird dieses Modell wegen der Möglichkeit der Thrombose der ebenfalls im Bestrahlungsfeld

gelegenen kleinen und kleinsten Gefäße sowie kortikaler Venen kritisiert. Dieses Modell wird heute nur noch selten eingesetzt.⁶²

5.2.2. Intrazerebrale Endothelin-Injektion

Dieses Schlaganfallmodell wurde erstmalig von Agnati et al¹ 1991 beschrieben.

Die Tiere werden zunächst in einem Stereotaxiegerät platziert. Im Anschluss wird eine Injektionsnadel in den piriformen Cortex ca. 0,5 mm dorsal der A. cerebri media eingeführt. Über diese Injektionsnadel wird entweder Endothelin-1^{1,145} oder Endothelin-3⁷⁰ injiziert.

Beide Agenzien verursachen einen schweren Vasospasmus mit nachfolgender Thrombose der benachbarten Arterien. Dieses Modell wird selten verwendet, da es hochgradig invasiv ist und eine direkte Verletzung des Gehirns durch die intrazerebrale Injektion verursacht.⁹¹

5.2.3. Clip-Modell

Dieses Modell wurde erstmals von Buchan et al²⁵ 1992 beschrieben.

Nach subtemporaler Kraniotomie wird die A. cerebri media mit Hilfe eines Gefäßclips direkt verschlossen. Durch die Entfernung des Clips kann zu einem definierten Zeitpunkt eine Reperfusion induziert werden.^{25,148}

Die Vorteile des Clip-Modells liegen in dem zuverlässigen Verschluss der A. cerebri media und in der guten Reproduzierbarkeit der Infarkte. Allerdings ist dieses Modell durch die Kraniotomie sehr invasiv und zeitaufwendig. Außerdem wird mit dem Clip ein körperfremdes Material in Kontakt mit der Gehirnoberfläche gebracht, was zu unterschiedlichen Komplikationen und zu Artefakten in der MRT-Bildgebung führen kann.⁹¹

5.2.4. Ligatur-Modell

Dieses Modell wurde erstmals von Robinson et al^{131,132} 1975 beschrieben, 1981 von Tamura et al¹⁵⁵ und 1986 von Bederson et al¹¹ weiterentwickelt.

Nach der Durchführung einer subtemporalen Kraniotomie und Darstellung der A. cerebri media erfolgt eine Ligatur dieses Gefäßes.^{30,148}

Die Vor- und Nachteile dieses Modells entsprechen denen des Clip-Modells.⁹¹

5.2.5. Okklusion mittels Kauterisierung

Dieses Modell zur Infarktinduktion wurde von Bederson et al¹¹ entwickelt.

Nach einer subtemporalen Kraniotomie werden der Hauptstamm der A. cerebri media und die im Umkreis von 2 bis 3 mm abgehenden Äste elektrisch kauterisiert.^{11,21,110,154,158}

Die Vor- und Nachteile dieses Modells entsprechen denen des Clip-Modells. Zusätzlich werden durch die Kauterisierung thermische und elektrische Schädigungen des Cortex verursacht.¹¹

6. Die Kernspintomographie an der Ratte

6.1. Physikalische Grundlagen

Moderne Kernspintomographen verfügen über ein starkes und möglichst homogenes Magnetfeld (bei klinischen Anwendungen üblicherweise zwischen 0,5-1,5 Tesla, für experimentelle Anwendungen bis über 10 Tesla). Dadurch richten sich die im Gewebe befindlichen paramagnetischen Atomkerne mit ungerader Protonenzahl (H⁺-Kerne) nach den Feldlinien aus und rotieren um diese Feldlinien. Diese Rotation wird auch als Präzession bezeichnet und erfolgt mit einer bestimmten Frequenz, die von der Stärke des äußeren Magnetfeldes abhängig ist (sog. Larmor-Frequenz).

Wird nun elektromagnetische Strahlung der Larmor-Frequenz in Form kurzer Hochfrequenzimpulse (HF-Impulse) quer zu den Feldlinien des äußeren Magnetfeldes eingestrahlt, können die Protonen die elektromagnetischen Wellen absorbieren und werden angeregt. Dabei gehen sie vom parallelen in den energiereicheren antiparallelen Zustand über, und die Präzession im Protonenkollektiv wird synchronisiert. Daraus resultiert eine messbare Quermagnetisierung, die letztendlich für das MRT-Signal verantwortlich ist. Nach dem Abschalten des Hochfrequenzimpulses kehren die Kerne in ihre energieärmere Ausgangslage zurück und geben die ursprünglich absorbierte elektromagnetische Strahlung als Radiowelle der Larmor-Frequenz, die mit einer Antenne als Radioimpulse empfangen werden können, wieder ab (Relaxation). Durch den Einsatz von Magnetfeldgradienten ist eine räumliche Zuordnung (Frequenz- und Phasenkodierung) möglich, so dass mit aufwendigen Rechenverfahren (Fouriertransformation) die Schnittbilder kalkuliert werden können.

Die Schnittorientierung der MRT-Bilder ist -im Gegensatz beispielsweise zur Computertomographie- variabel und erlaubt somit eine multiplanare Darstellung der Untersuchungsregion. Die Signaldifferenzen aus den einzelnen Geweben (Bildkontrast) ergeben sich aus deren Protonendichte, aus der Kopplung der relevanten Protonen an ihre jeweilige chemische Umgebung (Spin-Gitter-Relaxationszeit T1) sowie aus der gegenseitigen Beeinflussung der Protonen (Spin-Spin-Relaxationszeit T2). Die T1-Relaxation beschreibt, wie schnell die Protonen wieder vom antiparallelen in den parallelen Zustand zurückklappen und sich das magnetische Moment des untersuchten Gewebes wieder längs des äußeren Magnetfeldes anordnet. Die T2-Relaxation drückt aus, wie schnell die Synchronisation der Präzession verloren geht und sich die Quermagnetisierung wieder abbaut.

Durch den nicht-invasiven Charakter der MRT sind wiederholte Untersuchungen am gleichen Versuchstier möglich, was die Darstellung dynamisch ablaufender Vorgänge erleichtert. Während mit konventionellen Untersuchungsverfahren, die das Töten der Versuchstiere voraussetzen (z.B. Histopathologie) nur Einzelmessungen durchgeführt werden können, erlaubt die MRT die wiederholte Untersuchung am gleichen Tier, was auch die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduziert.^{9,14}

Die Kernspintomographie wird seit den späten 70er Jahren in der Forschung und seit den frühen 80er Jahren in der Klinik angewendet. Für die Untersuchung des zentralen Nervensystems ist dieses Verfahren wegen seines nicht-invasiven Charakters (Verzicht auf ionisierende Strahlen) und seiner guten Orts- und Kontrast-Auflösung besonders geeignet.

Die Abfolge der einzelnen HF- und Gradientenschaltungen wird dabei allgemein als Sequenz bezeichnet. Die am häufigsten klinisch verwendeten MR-Techniken sind: T1- und T2-gewichtete Spinecho- und Gradientenecho-Sequenzen, perfusions- und diffusionsgewichtete Bildgebung, die MR-Angiographie und die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRI).

Die T1-gewichtete Spin-Echo-Sequenz gibt die anatomischen Verhältnisse in guter Auflösung wieder. Diese Sequenz lässt einen frühen Hirninfarkt an drei Merkmalen erkennen: Zeichen einer lokalen Hirnschwellung infolge des zytotoxischen Ödems, parenchymale Hypointensität infolge der Verlängerung der T1-Zeit bei einem zytotoxischen Ödem und vaskuläres Enhancement nach Kontrastmittelgabe durch Verringerung der Hirnperfusion mit Verlangsamung des arteriellen Flusses bei

gleichzeitig kompensatorisch weitgestellten Gefäßen. Vasculäres (arterielles) Enhancement kann schon wenige Minuten nach Ischämiebeginn auftreten, ist jedoch kein absolut verlässlicher Indikator für einen irreversiblen Gewebsuntergang, da es auch bei lokaler Minderperfusion vorkommt. Außerdem tritt dieses Phänomen nicht immer bei einer akuten zerebralen Ischämie auf.⁶⁹

Im T2-gewichteten MRT-Bild erscheinen Hirninfarkte hyperintens. Eindeutige Signalveränderungen können jedoch frühestens 6 bis 8 Stunden nach Ischämiebeginn nachgewiesen werden. Eine Diagnose des Infarktes in der therapeutisch relevanten Frühphase ist mit T2-gewichteten Aufnahmen schwer möglich. Erst der Einstrom von Wasser in den Extrazellularraum, welches die Folge des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke ist, bewirkt einen signifikanten Anstieg der T2-Relaxationszeit (Phase des vasogenen Ödems). Da das infarzierte Hirngewebe aber auch während der Nekrose- und Resorptionsvorgänge mehr Wasser enthält als normales Gewebe, bleibt die Hyperintensität in T2-gewichteten Aufnahmen bis ins chronische Stadium des Infarktes bestehen.⁶⁹

Die Perfusions-MRT mit der so genannten dynamic susceptibility contrast-enhanced (DSC)-Technik ermöglicht die Messung der kapillären Perfusion und erfolgt mit einer T2*-Sequenz. Hierzu wird paramagnetisches oder superparamagnetisches Kontrastmittel als Bolus intravenös injiziert und die Signaländerung beim Durchgang des Kontrastmittels durch die interessierende Region mit Hilfe schneller MR-Sequenzen verfolgt. Bei der Kontrastmittelpassage kommt es in T2*-gewichteten Aufnahmen zum Signalabfall, der umso größer ist, je größer das perfundierte regionale zerebrale Blutvolumen ist. In ischämisches Gewebe mit pathologisch reduzierter Perfusion oder totalem Perfusionsausfall gelangt nur wenig Kontrastmittel. Deshalb behalten diese Regionen während des Bolusdurchgangs ihr hohes Ausgangssignal.⁶⁹

Die diffusionsgewichtete MR-Bildgebung ermöglicht die Messung kleinster, stochastischer Bewegungen der Wassermoleküle in vitro wie in vivo. Zu diesen tragen in vivo die Brownsche Molekularbewegung, die kapilläre Perfusion und mikroskopische Wasserverschiebungen zwischen unterschiedlichen Kompartimenten bei.⁶⁹ Die Diffusion des Wassers kann durch den Diffusionskoeffizienten ADC (apparenter Diffusionskoeffizient) quantifiziert werden. In akuten ischämischen Hirnläsionen lässt sich eine Wasserabwanderung aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment (zytotoxisches Ödem) beobachten, welche auf das

Ischämie-bedingte Versagen der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Pumpe zurückzuführen ist. Dies lässt sich durch die diffusionsgewichtete MR-Bildgebung als eingeschränkte Diffusion der Wassermoleküle bzw. Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten quantifizieren.^{14,27}

Aus dem Vergleich histopathologischer und MR-tomographischer Befunde⁹³ ergeben sich jedoch Hinweise, dass der Abfall des Diffusionskoeffizienten des Wassers nicht nur eine komplexe Funktion des Flüssigkeitsaustausches zwischen dem intra- und dem extrazellulären Kompartiment, sondern auch zwischen Nervenzellen und Glia zu sein scheint. MR-spektroskopische Untersuchungen zeigten zudem, dass intrazellulär auch Ischämie-bedingte Beeinträchtigungen energieabhängiger Zytoplasmaströmungen an der Reduktion des ADC in der Akutphase zerebraler Ischämien beteiligt sein müssen.^{38,40} Insgesamt erscheint die genaue Ursache des ADC-Abfalls im Rahmen zerebraler Ischämien noch weitgehend unverstanden. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass dieses Phänomen eher als ein Surrogatparameter denn als eine direkte Messgröße des zytotoxischen Hirnödems aufzufassen ist.⁹³

Experimentell wurde als erstes von Moseley et al. beschrieben, dass die Signalintensität auf den diffusionsgewichteten Bildgebungen von Katzenschädeln innerhalb von 15 Minuten nach Okklusion der A. cerebri media signifikant ansteigt. Im Gegensatz dazu zeigt die Signalintensität auf T2-gewichteten Bildgebungen erst nach 2 Stunden Abnormalitäten auf.^{99,113} Die Zunahme des Signals der diffusionsgewichteten Bildgebungen ist dadurch zu erklären, dass der apparente Diffusionskoeffizient (ADC) des Wassers im ischämisch geschädigten Gehirngewebe abnimmt. Schnelle diffusionsgewichtete Kernspintomographien und Spektroskopien haben gezeigt, dass der ADC-Abfall innerhalb weniger Minuten nach Ischämieinduktion erfolgt. Moseley et al haben vermutet, dass die ADC-Veränderungen durch die Bildung eines zytotoxischen Ödems begründet sind. Dies bedeutet, dass die Zellschwellung durch die partielle Relokalisierung des Wassers vom extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment begründet ist. Der Anstieg der T2-Relaxationszeit deutet auf das Vorhandensein eines vasogenen Ödems hin. Hierbei kommt es zu einem Flüssigkeitsaustritt aus dem zerebralen Gefäßsystem.^{72,117}

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Kernspintomographie ist die MR-Angiographie. Diese Technik erlaubt eine nicht-invasive Darstellung von

perfundierten Gefäßen aufgrund der magnetischen Eigenschaften „fließender“ Protonen.^{43,69,147} Grundsätzlich unterscheidet man zwei MR-Techniken, bei denen fließendes Blut kontrastgebend ist: Time-of-flight (TOF)- und die Phasen-Kontrast (PC)-MRA. Während beide Techniken die Beurteilung der vaskulären Morphologie ermöglichen, können mittels PC-MRT zusätzlich Flusskurven generiert werden, welche eine detaillierte Auskunft über Größe und Richtung des Blutflusses geben. Die Einführung der kontrastmittelverstärkten dreidimensionalen MRA hat die Möglichkeit der nicht-invasiven Darstellung der Blutgefäße erheblich erweitert. Diese Technik basiert auf der Verkürzung der T1-Relaxationszeit durch intravasales Kontrastmittel in Verbindung mit T1-gewichteten Sequenzen. Da die Bildgebung nicht von der Bewegung von Protonen abhängt, sind kaum Flussartefakte zu erwarten. Zudem können 3D-Datensätze mit hoher Auflösung akquiriert werden.⁶⁹

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet der MRT ist die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT). Mit dieser Technik können lokale Änderungen von Hirndurchblutung und Metabolismus nach gezielter Stimulation (z.B. motorisch, visuell, sensorisch) beobachtet werden. Ausgenutzt wird dabei, dass sauerstoffreiches und sauerstoffarmes Blut unterschiedliche magnetische Eigenschaften haben. Da aktivierte Hirnregionen mehr Sauerstoff erhalten als vom Gewebe verbraucht werden, zeigen sie während der Stimulation einen leichten Signalanstieg, der je nach Feldstärke bis zu 15% beträgt.¹⁴⁷

6.2. Die MRT-Morphologie des Rattengehirns

6.2.1. T2-gewichtete Bildgebung

Die Schnittführung durch das Gehirn kann in allen Raumrichtungen erfolgen. Die Schichtdicke beeinflusst die Untersuchungszeit und die Auflösung. Im Folgenden ist eine koronare Schnittführung von rostral nach caudal durch das Gehirn gesunder Sprague-Dawley Ratten mit einer Schichtdicke von 2mm dargestellt:²

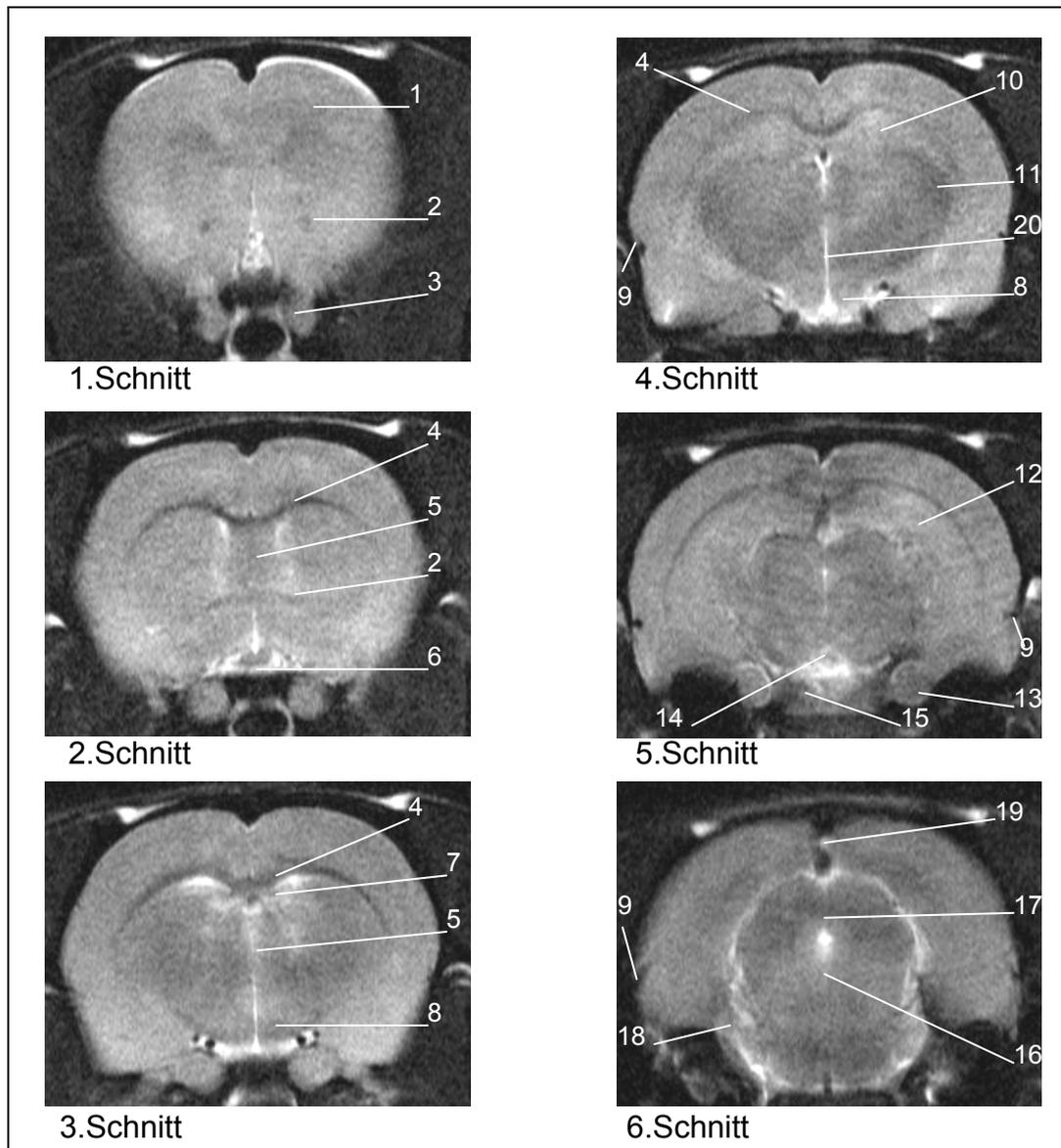


Abb.7: Morphologie des Gehirns (T2-gewichtete Bildgebung; Schichtdicke 2mm)
 1=rechte Hemisphäre; 2=Commissura anterior; 3=Nervus opticus; 4=Corpus callosum;
 5=Septum; 6=Chiasma opticum; 7=Seitenventrikel; 8=Hypothalamus; 9=Fissura rhinalis;
 10=Hippocampus dorsalis; 11=Thalamus; 12=Hippocampus; 13=N.trigeminus; 14=Nucleus
 interpeduncularis; 15=Hypophyse; 16=Raphe; 17=Aquaeductus cerebri; 18=Pedunculus
 cerebellaris medius; 19=Corpus pinealis; 20=Dritter Ventrikel

6.2.2. MR-Angiographie

Die MR-Angiographie erlaubt die nicht-invasive Darstellung der basalen Hirnarterien der Ratte. Mit dieser Technik kann bei tierexperimentellen Schlaganfallmodellen der erfolgreiche Verschluss der A. cerebri media, bzw. die erfolgreiche Rekanalisation überprüft werden.

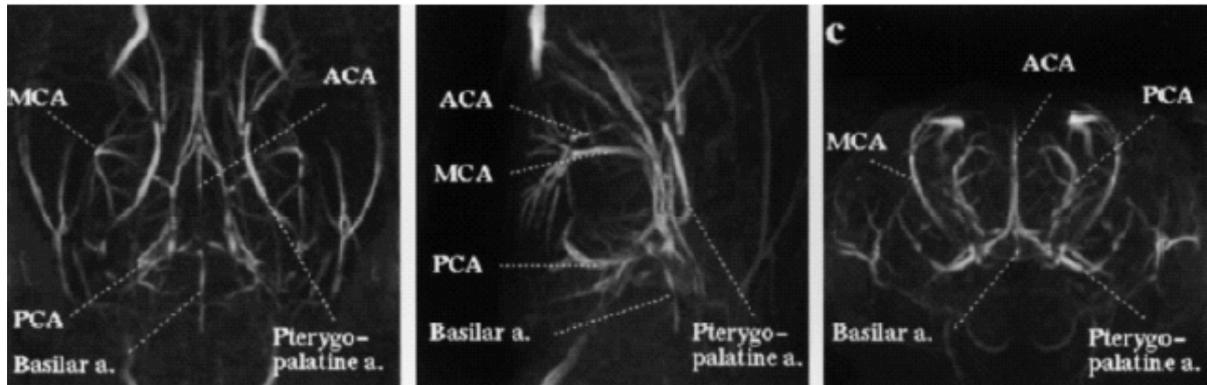


Abb.8: MR-Angiographische Darstellung zerebraler Arterien (aus: *Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents*; von Torsten Reese, Damien Bochelen, André Sauter, Nicolau Beckmann und Markus Rudin; in *NMR Biomedicine* 1999, Vol. 12, Seite 189-196)

ACA=A. cerebri anterior; MCA=A. cerebri media; PCA=A. cerebri posterior; Basilar a.=A. basilaris; Pterygopalatine a.=A. pterygopalatina

III. Material und Methoden

1. Allgemein

1.1. Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 8 bis 9 Wochen und einem Gewicht zwischen 300 und 350g von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden in Gruppen zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen vom Typ IV gehalten und erhielten Wasser und ein Alleinfuttermittel (Altromin[®]) zur freien Aufnahme.

1.2. Narkose

Alle Operationen am Tier, sowie die wiederholten MRT-Untersuchungen, wurden in Vollnarkose unter kontinuierlicher Überwachung der Atmung und Herzaktion durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5% Isofluran (Forene[®]) in 3,0 l/min Luft für etwa 2 Minuten. Die Erhaltungsdosis wurde bedarfsgesteuert und lag zwischen 2 bis 2,5% Isofluran in 0,5 l/min Luft bei erhaltener Spontanatmung. Während der gesamten Narkose wurde die Temperatur mit einer rektalen Sonde kontrolliert und mit einem thermostatisch regulierenden Wasserfluss-System zwischen 36,5-37,5°C gehalten.

1.3. Operationstechniken

1.3.1. Fadenmodell - Permanenter Verschluss der A. cerebri media

Die Tiere wurden im Halsbereich vom Unterkiefer bis zum Sternum geschoren und desinfiziert. Durch eine Mittellinieninzision der Haut am Hals und Präparation der Muskeln erfolgte die Darstellung der rechten A. carotis communis, der A. carotis externa und der A. carotis interna. Die A. carotis communis wurde distal permanent und die A. carotis interna transient mit einem 4-0 Faden ligiert. Durch eine Arteriotomie der A. carotis communis wurde ein 3cm langer, mit Silikon beschichteter 4-0 Nylonfaden in die A. carotis interna vorgeschoben bis ein leichter elastischer Widerstand zu spüren war, der anzeigte, dass sich die Spitze des Fadens in der A. cerebri anterior befand und somit den Blutfluss zur A. cerebri media blockiert. Dies gelang typischerweise bei einer Eindringtiefe zwischen 16 und 18 mm (gemessen ab

der Karotisbifurkation). Anschließend wurde der Okkluder mit einer Ligatur fixiert und der noch herausstehende Anteil gekürzt. Im Anschluss wurde der Wundverschluss mit einer fortlaufenden Hautnaht vorgenommen.

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere so lange gewärmt bis sie vollständig erwacht waren und sich frei bewegten. Im Anschluss wurden die Versuchstiere wieder in ihren Käfig zurückgebracht.⁸⁵

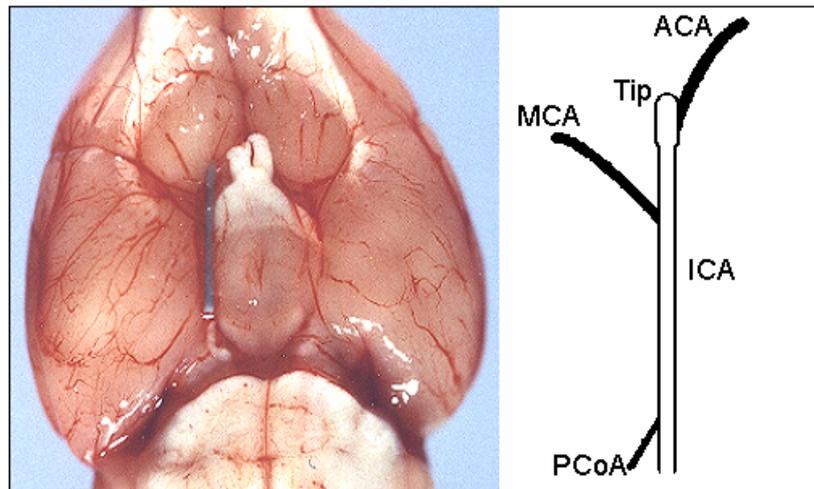


Abb.9: Fadenmodell: Der Nylonfaden (links, blau) verschließt die A. carotis interna in ihrem gesamten Verlauf und verschließt somit auch die MCA.

MCA = A. cerebri media; ACA = A. cerebri anterior; Tip = Fadenspitze; ICA = A. carotis interna; PCoA = A. communicans posterior

1.3.2. Fadenmodell - Ischämie-Reperfusionmodell

Bei dem Reperfusionmodell wurde der erste Operationsabschnitt analog zum permanenten Verschluss der A. cerebri media durchgeführt. Nach einer Ischämiedauer von 85 Minuten wurde erneut eine Isofluran-Narkose eingeleitet. Nach Erreichen der Operationstoleranz wurde die Operationsnarbe erneut eröffnet. Nach 90 Minuten wurde der Faden herausgezogen und die A. carotis communis erneut ligiert. Die Reperfusion setzt trotz Verschluss der A. carotis communis ein, da der Blutfluss zur A. cerebri media über die A. communicans anterior erfolgt. Die Wunde wurde erneut verschlossen.

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere so lange gewärmt bis sie vollständig erwacht waren und sich frei bewegten. Im Anschluss wurden die Versuchstiere wieder in ihren Käfig zurückgebracht.

1.3.3. Makrosphärenmodell – Permanenter Verschluss der A. cerebri media

Analog zum Fadenmodell erfolgten der Hautschnitt und die Freipräparation der rechtsseitigen A. carotis communis einschließlich ihrer Äste. Die A. carotis communis wurde distal vorübergehend mit einem 4-0 Faden ligiert. Die A. pterygopalatina, die A. occipitalis und die A. thyreoidea superior wurden doppelt ligiert und durchtrennt. Im Anschluss erfolgte eine transiente Ligatur der A. carotis interna hinter dem Abgang der A. pterygopalatina. Der distale Anteil der A. carotis externa wurde proximal doppelt ligiert und anschließend durchtrennt, um so einen A. carotis externa-Stumpf von ca. 5mm Länge zu schaffen.

Ein Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,965mm) wurde mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung und 6 Keramik-Makrosphären befüllt. Die in diesem Modell verwendeten Makrosphären bestanden aus gesintertem Titanoxid (TiO₂) und wiesen einen Durchmesser zwischen 0,315 bis 0,355mm auf (BRACE GmbH, Alzenau). Der gefüllte Katheter wurde durch eine Arteriotomie in den Stumpf der A. carotis externa eingeführt. Während dieser Prozedur erfolgte eine vorübergehende Ligatur der A. carotis communis und der A. carotis interna für etwa 2 Minuten, um Blutverluste zu vermeiden. Im Anschluss wurde der Katheter bis zur Karotisbifurkation vorgeschoben und dort mit einer Ligatur fixiert. Die Katheterspitze wurde dabei so positioniert, dass der Blutfluss von der A. carotis communis in die A. carotis interna nicht beeinträchtigt wurde. Nach Öffnung der transienten Ligaturen waren somit physiologische Durchblutungsverhältnisse in der A. carotis interna gegeben. Anschließend wurden die 6 Makrosphären vorsichtig und einzeln mit jeweils etwa 0,05ml Kochsalzlösung in die Karotisbifurkation eingespült bis sie durch den physiologischen Blutfluss in der A. carotis interna erfasst und so in die Hirnbasisarterien getragen wurden. Nach der Injektion wurde die A. carotis communis nochmals temporär ligiert und die A. carotis interna vorsichtig unter Sichtkontrolle mit etwa 0,5ml Kochsalzlösung gespült. Dabei wurde der Spüldruck manuell so reguliert, dass eine sichtbare Dilatation der A. carotis interna vermieden wurde. Anschließend erfolgte ein erneuter temporärer Verschluss der A. carotis communis und interna für ca. 20 Sekunden, um den Katheter zu entfernen und den Stumpf der A. carotis externa mit einem 4-0 Faden zu ligieren. Am Ende der Operation wurden alle transienten Ligaturen entfernt und die Wunde mit einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen.

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins gewärmt und danach wieder in ihren Käfig zurückgebracht.⁵⁰

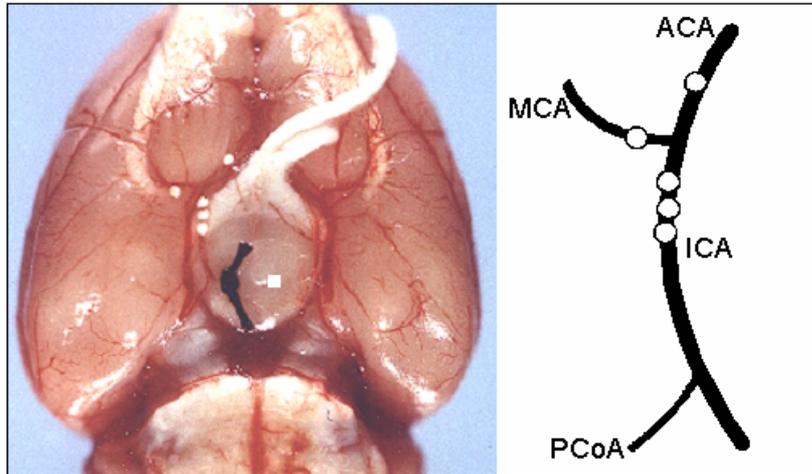


Abb.10: Die weißen TiO_2 -Makrosphären (0.315-0.355mm Durchmesser) sind makroskopisch bereits leicht erkennbar. Sie liegen im MCA- und ACA-Hauptstamm sowie in der distalen A. carotis interna (links).

MCA = A. cerebri media; ACA = A. cerebri anterior; ICA = A. carotis interna; PCoA = A. communicans posterior

1.4. Physiologische Parameter

1.4.1. Blutentnahme und Analyse

Als arterieller Zugang wurde die linke A. femoralis gewählt, welche durch einen Hautschnitt in der Leiste dargestellt und distal permanent sowie proximal temporär mit einem 4-0 Faden ligiert wurde. Durch eine Arteriotomie wurde ein Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,38mm, Innendurchmesser: 1,09mm) in das Gefäß eingeführt und nach Öffnung der temporären Ligatur ca. 3cm vorgeschoben. Anschließend erfolgte die Fixierung des Katheters mit einer Ligatur. Über den so eingebrachten Katheter erfolgten eine Blutentnahme (jeweils ca. 0,3 ml) mit Hilfe einer heparinisierten Insulinspritze und/oder die arterielle kontinuierliche Blutdruckmessung. Im Anschluss wurde der Katheter mit ca. 0,25 ml physiologischer Kochsalzlösung freigespült. Nach Blutentnahme bzw. Beendigung der kontinuierlichen Blutdruckmessung erfolgten die Entfernung des Katheters und eine Ligatur des Gefäßes um Blutungen zu vermeiden. Die Wunde wurde am Ende der Operation mit einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen.

1.4.2. Blutgase und Blutdruck

Die Blutproben wurden mit einem Blutgasanalysegerät (Chiron Diagnostics 865, Bayer®) analysiert. Dabei erfolgte eine temperaturkorrigierte Bestimmung des pH-Wertes, des O_2 - und des CO_2 -Partialdrucks.

Der Blutdruck wurde in der A. femoralis kontinuierlich mit Hilfe eines Druckwandlers gemessen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Kreislaufüberwachungsmonitors (Siemens Sirecust 1280). Der arterielle Mitteldruck wurde zu definierten Zeitpunkten im Studienprotokoll dokumentiert.

1.5. MRT-Technik

1.5.1. Fixierung der Versuchstiere

Die narkotisierten Versuchstiere wurden in einer speziellen Haltevorrichtung fixiert, um Vibrationsartefakte während der Messungen zu vermeiden. Dazu wurden die Schneidezähne in einer Kunststoffhalterung befestigt. Mit dieser Halterung wurde der Kopf der Versuchstiere fest in eine konusförmig ausgefräste Kopfhalterung hineingezogen. Zwei in die Vorderpartie dieser Kopfhalterung eingebrachten Bohrungen gewährleisteten den Zu- und Abfluss des Narkosegases. Anschließend wurden die so fixierten Versuchstiere im Kernspintomographen platziert. Die Bestimmung der Atemfrequenz erfolgte über die gesamte Versuchsdauer mit Hilfe einer Drucksonde, die unter dem Brustkorb des Tieres positioniert wurde. Die Anästhesie wurde mit 1-2% Isofluran in 0,5l/min Luft aufrechterhalten. Die Dosis wurde so angepasst, dass die Atemfrequenz zwischen 50-70/min lag. Die Körperkerntemperatur wurde während der gesamte Versuchszeit mit einer rektalen Messsonde überwacht und mit einem thermostatisch regulierenden Wasserflusssystem bei 37°C gehalten.



Abb.11: Rattenhalterung

1.5.2. Der Magnetresonanztomograph

Die Halterung wurde dann in einem linearpolarisierenden Volumenresonator mit einem Durchmesser von 60mm platziert. Tuning und Matching erfolgten manuell.

Der Kernspintomograph (Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T, 16cm; Ettlingen, Deutschland) arbeitet mit 300,51 MHz für das Isotop ^1H und ist mit einem allseits abgeschirmten Gradientensystem (300mT/m) ausgestattet.



Abb.12: Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T

1.5.3. Bildgebung

1.5.3.1. Localizer

Zur groben Positionierung der Versuchstiere im Magnetfeld wurde eine Spinecho-Sequenz mit Repetitionszeit (TR) = 150ms, Echozeit (TE) = 12ms und einer Schichtdicke von 4mm verwendet. Drei orthogonale Schichten (axial, koronar und sagittal) erlaubten dabei die Beurteilung der Position des Schädels im dreidimensionalen Raum. Die Positionierung der Tiere wurde entsprechend durch Verschieben oder Drehen des Resonators optimiert.

1.5.3.2. Feinjustierung

Zur Beurteilung von Mittellinienverlagerungen und zur genauen Quantifizierung des rechten und linken Hemisphärenvolumens sind besondere Anforderungen an die exakte Positionierung der Versuchstiere im Magnetfeld zu stellen (s.u.). Zum Ausgleich geringer Abweichungen von einer streng koronaren Schnitfführung wurden daher mehrfach RARE-(Rapid acquisition with relaxation enhancement) Sequenzen

abgeleitet, die eine präzise Beurteilung der Positionierung ermöglichen. Bei der dazu verwendeten RARE -Technik handelt es sich um eine T2-gewichtete Sequenz mit geringer Schichtdicke und sehr kurzer Messzeit (TR = 2500ms, TE = 41.8ms, Schichtdicke: 1mm). Die exakte koronare Ausrichtung der Schnitfführung wurde danach winkelnkorrigiert und durch eine weitere RARE-Sequenz verifiziert. Dieses Verfahren wurde ggf. wiederholt, bis eine optimale Positionierung gegeben war.

1.5.3.3. Diffusionsgewichtete Bildgebung

Zur topographischen Erfassung des Diffusionskoeffizienten des Wassers (ADC) wurden diffusionsgewichtete Bilder mit einer fettunterdrückenden EPI (Echo-Planar-imaging) -Sequenz erfasst. Zur Optimierung der Bildqualität wurde ein sog. Volumen-Shim mit einer volumenselektiven Doppel-Spinecho Spektroskopiesequenz (Repetitionszeit (TR) = 1s, Echozeit (TE) = 30ms, Voxel-Größe 10x8x15mm³) vor Akquisition der ersten Diffusionsserie durchgeführt. Die erreichte Halbwertsbreite des Wassersignals (FWHM), aufgenommen mit der Doppel-Spinecho Sequenz, betrug ungefähr 25-35Hz. Erst danach wurden die ersten Diffusionsmessungen durchgeführt.

Sechs aufeinander folgende koronare Schnitte mit einer jeweiligen Dicke von 2mm wurden in einem field of view (FOV) von 32x32mm und einer Matrixgröße von 128x128 (Repetitionszeit (TR) = 3003ms, Echozeit (TE) = 38.6ms, 4 Averages) erfasst. Zur Minimierung von durch lokalen Feldinhomogenitäten verursachten Bildartefakten wurde eine Fast-Segmentierung verwendet. Die diffusionsgewichteten Untersuchungen wurden fünfmal mit unterschiedlichen Diffusionsgradientenwerten (10, 40, 70, 100 und 130mT/m) wiederholt, um eine quantitative Erfassung des Diffusionskoeffizienten des Wassers (ADC) zu ermöglichen. Mit einer Diffusionsgradientendauer (δ) von 9ms und einer Gradientenseparationszeit (Δ) von 15ms resultieren diese fünf Werte (6.96, 111.3, 340.8, 695.6 und 1175.5s/mm²). Die Akquisitionszeit für die gesamte EPI-Sequenz betrug 4.5 Minuten.

Mit der Bildverarbeitungssoftware Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) wurden anschließend topographische ADC-maps berechnet.

1.5.3.4. T2-Bildgebung

Die T2-Relaxationszeit wurde mit Hilfe einer CPMG (Carr Purcell Meiboom Gill) Spinecho-Sequenz kartographiert. 8 Schichten mit einer Dicke von 2mm wurden mit einem field of view (FOV) von 37x37 mm und einer Matrixgröße von 512x256 (Repetitionszeit (TR) = 3833.5ms, 90° Anregungswinkel und 180° Refokussierungspuls, number of excitations (NEX) = 1) erfasst. 12 Echos wurden aufgenommen, angefangen mit TE = 18ms (Schrittgröße $\Delta TE=18ms$), was zu einer aufsteigenden Reihe von 18 bis 216ms führt. Die Akquisitionszeit für die gesamte CPMG Sequenz betrug 16 Minuten und 21 Sekunden.

T2-maps wurden ebenfalls unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) berechnet.

1.5.3.5. Protonen- und T2-gewichtete Bildgebung

Anatomisch hochauflösende Protonen- und T2-gewichtete Doppelkontrast-Spinechosequenzen wurden zur planimetrischen Berechnung der Hemisphärenvolumina verwendet (s.u.). Dazu wurden acht aufeinander folgende koronare Schichten mit einer Schichtdicke von 2mm, einem field of view von 37x37 mm und einer Matrixgröße von 512x256 (Repetitionszeit (TR) = 3000 ms) erfasst. Dabei wurden 2 Echos mit einer Echozeit von TE = 27ms und TE = 72ms aufgenommen. Die Akquisitionszeit für diese Sequenz betrug 25 Minuten und 36 Sekunden.

1.5.3.6. Arterielle Magnetresonanzangiographie

Die intrakraniellen hirnversorgenden Arterien wurde mit Hilfe einer 2D-Time-of-flight-Angiographie dargestellt. 80 aufeinander folgende koronare Schichten wurden mit einer Schichtdicke von 0.3mm, einem field of view von 37x37 mm und einer Matrixgröße von 256x128 (Repetitionszeit (TR) = 25ms) erfasst. Dabei betrug die Echozeit TE = 5ms, der Anregungswinkel 90° und die Akquisitionszeit 25 Minuten und 36 Sekunden.

Im Anschluss wurde mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) eine dreidimensionale Rekonstruktion der Hirnarterien errechnet.

1.6. Klinisch-neurologische Beurteilung

Die klinisch-neurologische Untersuchung der Versuchstiere erfolgte zu definierten Zeitpunkten (vgl. Kap. III), die so gewählt wurden, dass ein ausreichender zeitlicher Abstand zur letzten Narkose gegeben war. Dadurch wurde eine Beeinflussung der klinischen Befunde durch einen etwaigen Narkoseüberhang minimiert.

Die neurologische Untersuchung erfolgte nach einer von Zea Longa und Mitarbeitern entwickelten 6-Punkte Skala.⁹⁸

0	Keine Neurologische Beeinträchtigung
1	Extensionsdefizit der linken Vorderpfote
2	Gangabweichung nach links („Circling“)
3	Fallneigung nach links
4	Verlust der Gehfähigkeit; Vigilanzminderung
5	Tod

Abb.13: 6-Punkte Skala zur klinisch-neurologischen Untersuchung der Ratte, modifiziert nach Zea Longa et al.⁹⁸

Zunächst wurden die Tiere am Schwanz etwa 30 cm über den Boden angehoben. Gesunde Ratten zeigten bei dieser Prozedur eine reflektorische Extension beider Vorderpfoten. Das Fehlen der Extension auf einer Seite deutete auf das Vorliegen einer Hemiparese hin.



Abb.14: Fehlen der Extension der linken Vorderpfote als Zeichen einer linksseitigen Hemiparese bei Infarzierung der rechten Hemisphäre.

Anschließend wurden die Tiere auf den Boden gesetzt und das Gangbild beobachtet. Tiere mit einer ausgedehnten hemisphäraler Schädigung waren nicht mehr in der

Lage geradeaus zu laufen und zeigten eine charakteristische Gangabweichung nach links. In schweren Fällen liefen die Tiere ausschließlich in engen Kreisen („Circling“).

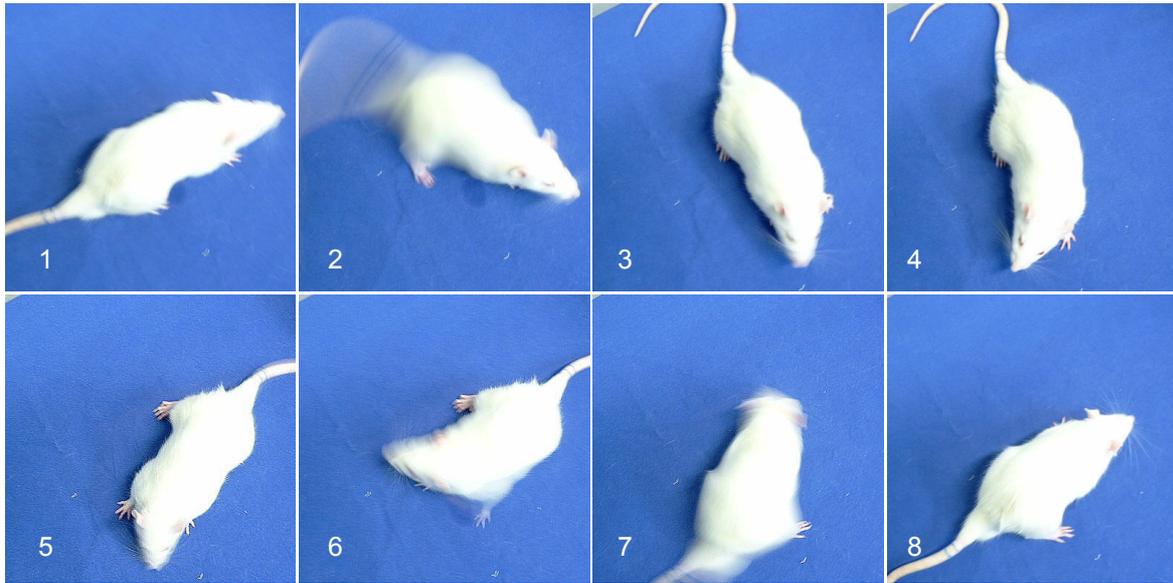


Abb.15: „Circling“: Schwere Gangabweichung nach rechts bei Infarzierung der rechten Hemisphäre.

Bei zunehmenden Schädigungen der Hemisphäre kam es als Ausdruck einer schwersten Hemiparese zu einer Fallneigung nach links, die im Extremfall zu einem Verlust der Gehfähigkeit führte.

1.7. Gewebeuntersuchung

1.7.1. Probenentnahme

Die Tiere wurden spätestens 24 Stunden nach Beginn des Versuches getötet. Dazu wurde zunächst eine Gasnarkose eingeleitet (5% Isofluran in 3,0 l/min. Luft) bis sie tief anästhesiert waren. Im Anschluss wurden die Tiere dekapitiert. Danach wurde die Kopfhaut dorsal mit einer Mittellinieninzision von caudal nach rostral eröffnet. Die Haut wurde an beiden Seiten nach lateral gezogen, wodurch die Schädelkalotte freigelegt wurde. Caudal wurde das Os occipitale mit einer Knochenzange entfernt, so dass das Kleinhirn sichtbar werden konnte. Anschließend wurde das Os frontale rostral mit einer Feinsäge durchtrennt. Mit einer kleinen Schere wurde die Kalotte entlang der Sutura interfrontalis eröffnet und beide Kalottenhälften komplett mit einer Knochenzange vom Gehirn abgehoben. Nach vorsichtiger Entfernung der Dura wurde das Gehirn mit Hilfe eines feinen Spatels herausgelöst.

Bei Verwendung des Makrosphärenmodells wurde anschließend die Lage der Sphären in den Hirnbasisarterien durch Inspektion unter dem Operationsmikroskop

ermittelt und genau protokolliert. Wenn eine oder mehrere Kugeln den A. cerebri media-Hauptstamm blockierten oder wenn der distale Anteil der A. carotis interna und die A. carotis anterior okkludiert waren, war der Blutfluss zur A. cerebri media blockiert. Wenn sich keine Kugeln im A. cerebri media-Hauptstamm befanden und der Blutfluss zur A. cerebri media über die A. carotis anterior erfolgen konnte, wurden diese Tiere ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer intrazerebralen oder einer subarachnoidalen Blutung, die sich ebenfalls bei der visuellen Inspektion des Gehirns zeigten. Nach makroskopischer Beurteilung wurde das Gehirn ca. 1h bei einer Temperatur von -20°C gefroren.

Nach Anfrieren des Gehirns wurden das Kleinhirn und das Riechhirn mit einer Rasierklinge abgesetzt. Das Präparat wurde dann analog zur Schnittführung im MRT in 6 koronare Schichten mit einer jeweiligen Dicke von 2mm eingeteilt und geschnitten.

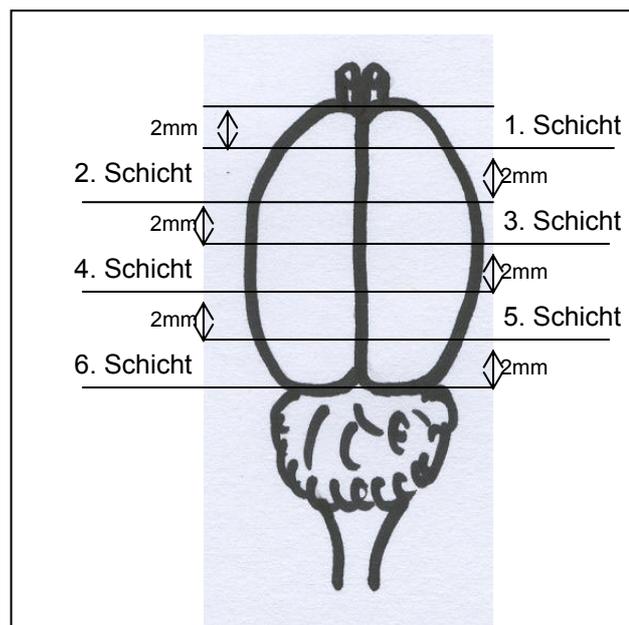


Abb.16: Schnittführung

1.7.2. TTC-Färbung

2,3,4,-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC) wird seit 1958 zur Färbung ischämischer Infarkte verwendet. Die Anwendung dieser Technik zum Nachweis ischämischer Hirninfarkte wurde erstmals 1986 von Bederson et al beschrieben.¹⁰

TTC ist ein wasserlösliches Salz. Es wird durch Dehydrogenasen und mitochondriale Enzyme in lebenden Zellen zu einem tiefroten, fettlöslichen Farbstoff (Formazan) reduziert. Dies geschieht aber nicht im nekrotischen Gewebe, da die Aktivität der

Dehydrogenase und der mitochondrialen Enzyme mit dem Tod der Zelle erlischt und so dieses Gewebe ungefärbt bleibt. Dadurch grenzt sich das gesunde Gewebe klar vom abnormalen Gewebe ab.¹⁰

Zur Färbung des Hirngewebes wurde eine 2%ige-Lösung von 2,3,4,-Triphenyltetrazolium-Chlorid hergestellt, die bei einer Temperatur von 37°C angesetzt wurde. Die sechs frischen Hirnpräparate (Dicke: 2mm) wurden in dieser Lösung für ca. 15 Minuten bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und anschließend in 10%iger Formalinlösung (Roti® Histofix) fixiert und bei +4°C aufbewahrt.¹⁰

1.7.3. Computergestützte Planimetrie

Die fixierten Präparate wurden mit einem Computer-Scanner (ScanJet 3400C, Hewlett Packard®, Deutschland; Auflösung 600x600dpi) digitalisiert.

Die ungefärbten Gebiete der fixierten Gehirnschichten wurden als Infarktgebiete definiert. Unter Verwendung einer Bildanalyse-Software (Image J 1,25s; National Institutes of Health, USA) wurde die Größe der beiden Hemisphären und der kortikalen und subkortikalen Infarktanteile für jeden coronaren Schnitt planimetriert. Der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens (%HLV) wurde berechnet und für den raumfordernden Effekt des Hirnödems korrigiert. Dazu wurde folgende Formel verwendet: $\%HLV = LV / HV_i$, wobei LV das direkte Läsionsvolumen und HV_i das ipsilaterale Hemisphärenvolumen darstellt. Beide Volumina wurden durch eine Multiplikation aller Schichten mit 2mm (Schichtdicke) und einer anschließenden Addition errechnet. Kortikales und subkortikales hemisphärales Läsionsvolumen wurden in gleicher Weise berechnet. Infarkte des Hypothalamus waren auf diesen Präparaten leicht erkennbar (vergl. Abb.17).⁹⁴ Die Messungen der Infarktgrößen und das Vorliegen eines Hypothalamusschadens erfolgten durch einen Untersucher, der für die Randomisierung der Versuchstiere und die klinischen Befunde geblindet war.



Abb.17: TTC-Färbung; die weißen, ungefärbten Gebiete zeigen das Infarktareal

1.8. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® for Windows (Standardversion 10.0., SPSS Incorporation, Chicago, USA) ausgewertet:

Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde für die Testung auf Normalverteilung der parametrischen Daten verwendet. Ihm folgte eine Varianzanalyse (ANOVA=Analysis of Variance). Danach wurden die einzelnen Gruppen einem paarweisen post-hoc Vergleich mit dem Scheffe´ Test unterzogen.

Nicht-parametrische Werte, wie die ermittelten Parameter der neurologischen Untersuchung, wurden bei einem Mehrfachvergleich mit dem Kruskal-Wallis Test analysiert. Diesem folgte eine nicht-parametrische, paarweise post-hoc-Analyse (Tukey-Kramer Methode). Bei einem paarweisen Vergleich wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen.

Die Daten wurden als Mittelwert +/-Standardabweichung oder Median ± Range dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

1.9. Testsubstanzen und Applikationstechnik

Der NMDA-Antagonist Dizocilpin (MK-801, Sigma®) wurde in steriler 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst (1mg/ml). Das Medikament wurde als intraperitoneale Injektion verabreicht.

2. Studiendesign

Sämtliche der hier beschriebenen Tierversuche erfolgten nach Prüfung und Genehmigung durch das bioethische Komitee des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Gesichtspunkte des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.Mai 1998 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr.30, S: 1105) ordnungsgemäß behandelt und untergebracht. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. W. Schaper (Max Planck Institut, Bad Nauheim) und des Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiters Prof. Dr. F. Pierau (Max Planck Institut, Bad Nauheim). Ferner wurden die Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) eingehalten.

2.1. Experiment I: Neuroprotektionsstudie mit Dizocilpin

2.1.1. Ziel

Durch den direkten Vergleich zwischen dem Makrosphärenmodell und dem Fadenmodell sollte überprüft werden, ob sich Hypothalamusinfarkte bei permanenten Verschlüssen des MCA-Hauptstammes mit einem dieser Modelle vermeiden lassen. Ferner sollte gezeigt werden ob das Auftreten ischämischer Schädigungen des Hypothalamus zu einer Änderung der Temperaturregulation der Ratte (Hyperthermie) führt.

Schließlich sollte anhand der Beispielsubstanz Dizocilpin der Einfluss der pathologischen Hyperthermie auf tierexperimentelle Neuroprotektionsstudien getestet werden.

2.1.2. Versuchsgruppeneinteilung

In dieser Studie wurden die Tiere in 3 Versuchsgruppen mit je 20 Tieren eingeteilt, wobei in jeder Gruppe jeweils 10 Tiere mit Dizocilpin und 10 weitere Tiere mit Placebo behandelt wurden.

Der Verschluss der A. cerebri media erfolgte bei den Tieren der Gruppe I mit dem Fadenmodell, in Gruppe II mit dem Makrosphärenmodell. Die Tiere der Gruppe III wurden mit einem modifizierten Makrosphärenmodell behandelt, wobei 10 anstatt der üblichen 4 Sphären verwendet wurden. Dadurch sollte eine vollständige Verlegung des intrakraniellen Abschnitts der A. carotis interna erzielt und dadurch die gleichen Bedingungen wie bei Verwendung des Fadenmodells eingehalten werden.

Gruppe I	Fadenmodell	Dizocilpin	10 Tiere
		Placebo	10 Tiere
Gruppe II	Makrosphärenmodell	Dizocilpin	10 Tiere
		Placebo	10 Tiere
Gruppe III	Modifiziertes Makrosphärenmodell	Dizocilpin	10 Tiere
		Placebo	10 Tiere

Tab.1: Versuchsgruppeneinteilung

2.1.2. Studienablauf

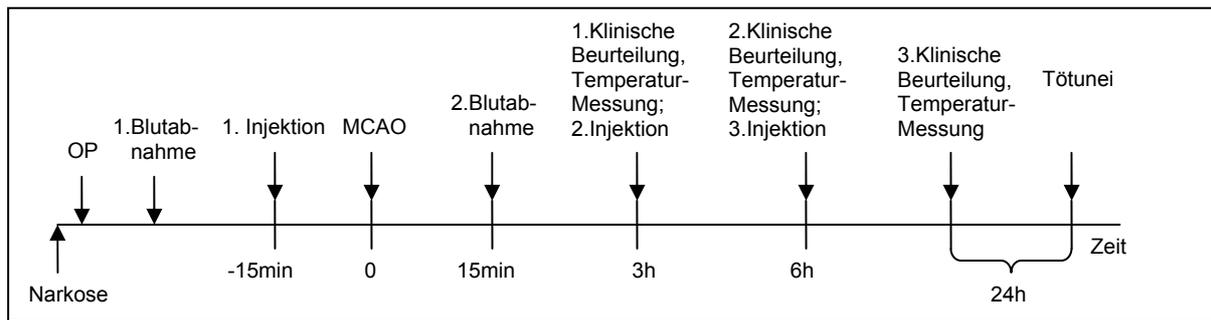


Abb.18: Studienablauf

Die Tiere wurden zunächst narkotisiert. Nach Erreichen der Operationstoleranz wurde die rektale Temperatursonde eingeführt und ein arterieller Katheter gelegt. Nach Entnahme der Blutprobe wurde diese auf die Parameter O_2 -Partialdruck, CO_2 -Partialdruck und pH untersucht. Anschließend erfolgte die Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die Tiere erhielten entweder Dizocilpin (1mg/kg in 1ml 0,9%ige NaCl gelöst) oder Placebo (1ml NaCl) als intraperitoneale Injektion. Die Ischämieinduktion erfolgte mit dem Faden- (Gruppe I) oder Makrosphärenmodell (Gruppen II und III) 15 Minuten nach Medikamentengabe. Nach weiteren 15 Minuten wurde erneut eine Blutprobe entnommen und analysiert. Anschließend wurde nochmals der mittlere arterielle Blutdruck bestimmt. Direkt im Anschluss wurde der Katheter aus der Arterie entfernt und die Wunde verschlossen. Das Tier konnte sich nun von der Operation erholen.

Die Medikamentengabe (1mg/kg Dizocilpin in 1ml 0,9% NaCl oder 1ml 0,9% NaCl (Placebo)) wurde 3 und 6 Stunden nach Okklusion der A. cerebri media wiederholt.

Die neurologische Beurteilung und die Messung der Körperkerntemperatur erfolgten 3, 6 und 24 Stunden nach Ischämieinduktion.

Die Tötung der Tiere erfolgte 24 Stunden nach Ischämieinduktion. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und mit TTC gefärbt.

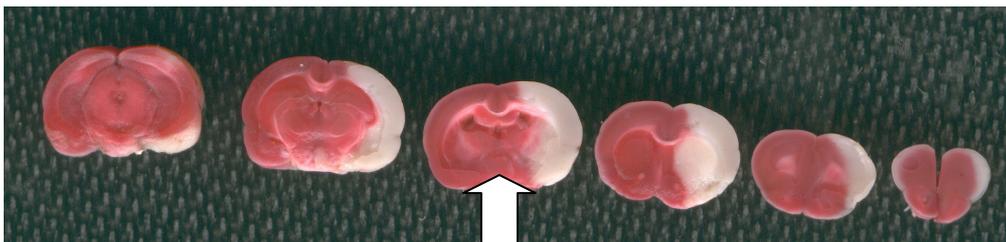


Abb.19: TTC-Färbung: Hirninfarkt im Versorgungsgebiet der A. cerebri media. Der Hypothalamus ist nicht betroffen (Pfeil).

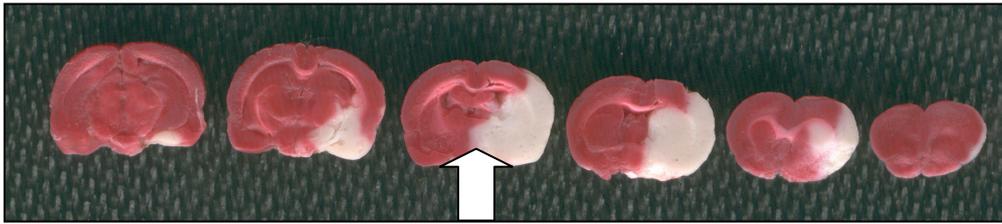


Abb.20: TTC-Färbung: Hirninfarkt im Versorgungsgebiet der A. cerebri media mit Beteiligung des Hypothalamus (Pfeil).

Die computergestützte planimetrische Ermittlung der Infarktvolumina erfolgte durch einen für die Randomisierung und klinische Befunde geblindeten erfahrenen Untersucher.

2.1.3. Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden vor dem Beginn der Experimente definiert:

- Fehlen eines Infarktes im Versorgungsgebiet der A. cerebri media in der TTC-Färbung
- Vorliegen einer subarachnoidale oder intrazerebralen Blutung bei der postmortalen Inspektion

Alle ausgeschlossenen Tiere wurden ersetzt.

2.1.4. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte wie unter Punkt 1.8. beschrieben. Um zusätzlich eine Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur und des Vorhandenseins eines Hypothalamusinfarktes zu bestimmen, wurden die Daten aller experimenteller Gruppen zusammengefasst und mit der Spearman-Rho Korrelation analysiert.

2.2. Experiment II: Vergleich der Komplikationen des Faden- und Makrosphärenmodells

2.2.1. Ziel

Mit diesem Experiment sollten Art und Häufigkeit modellimmanenter Komplikationen des Faden- und des Makrosphärenmodells ermittelt werden. Zur Überprüfung des intrakraniellen Gefäßstatus wurde dazu die MR-Angiographie eingesetzt.

2.2.2. Versuchsgruppeneinteilung

In dieser Studie wurden die Tiere in drei Versuchsgruppen mit je zehn Tieren eingeteilt. In Gruppe I wurden die Tiere dem Fadenmodell mit einer 90minütigen Reperfusion und in Gruppe II dem permanenten Faden-MCA-Verschlussmodell unterzogen. In Gruppe III wurde das Makrosphärenmodell, welches ebenfalls zu einer permanenten Okklusion der A. cerebri media führt, verwendet.

Zuvor wurde in einer Pilotstudie überprüft, ob sich die unterschiedlichen MCA-Verschlussmodelle bezüglich ihrer Auswirkungen auf physiologische Parameter (Blutdruck, Blutgase, Blutglukose) unterscheiden.

2.2.3. Studienablauf

2.2.3.1. Pilotstudie

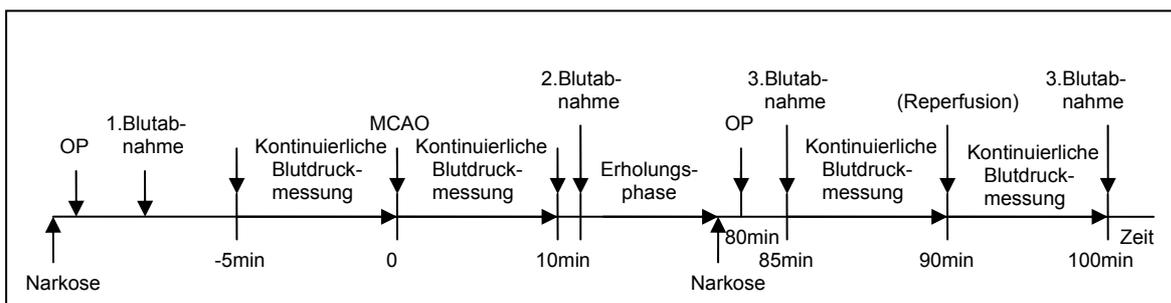


Abb.21: Studienaufbau der Pilotstudie

Nach Narkoseeinleitung wurde zunächst Blut zur Blutgasanalyse und Glucosemessung gewonnen. Nach kontinuierlicher Blutdruckmessung über einen Zeitraum von 5 Minuten wurde die A. cerebri media mit Hilfe des Fadenmodells (Gruppe I und II) oder des Makrosphärenmodells (Gruppe III) okkludiert. Anschließend erfolgte eine weitere kontinuierliche Blutdruckmessung für 10 Minuten. Bevor der Katheter entfernt wurde, erfolgte eine erneute Blutentnahme. Nach Beendigung der Operation und Verschluss der beiden Operationswunden erhielten die Tiere eine Ruhepause für ca. 75 Minuten. Anschließend erfolgte eine erneute Narkoseeinleitung zur Entnahme einer dritten Blutprobe, gefolgt von einer weiteren kontinuierlichen Blutdruckmessung. Danach (90. Minute) wurde bei den Tieren der Gruppe I durch Herausziehen des Fadens eine Reperfusion eingeleitet. Im Anschluss erfolgte in allen Gruppen eine kontinuierliche Blutdruckmessung für 10 Minuten, die

mit der 4. Blutentnahme beendet wurde. Nach Operationsende wurden die Tiere in tiefer Narkose durch eine Dekapitation getötet.

2.2.3.2. Studienaufbau der Hauptstudie

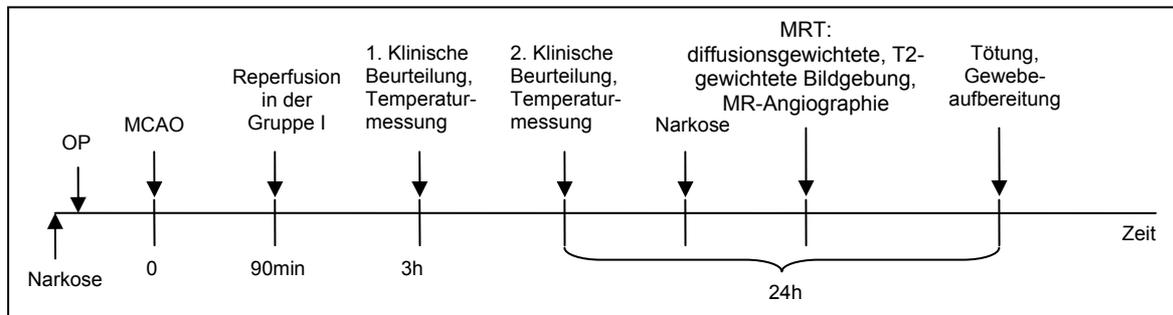


Abb.22: Studienaufbau der Hauptstudie

Nach Narkoseeinleitung erfolgte die Ischämieinduktion mit dem Fadenmodell oder Makrosphärenmodell. Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere wieder in ihren Käfig verbracht und konnten sich dort von der Operation erholen. Die Tiere der Gruppe I wurden nach einer 90 minütigen Ischämie erneut für wenige Minuten narkotisiert, um durch Zurückziehen des Fadens eine Reperfusion einzuleiten.

Die neurologische Beurteilung der Tiere erfolgte 3 und 24 Stunden nach Ischämieinduktion. Gleichzeitig wurde die Körperkerntemperatur mit einer rektalen Temperatursonde gemessen. Die Messungen nach 24 Stunden erfolgten vor der Kernspintomographie.

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Ischämieinduktion erneut narkotisiert und in dem Kernspintomographen fixiert. Nach exakter Positionierung und Feinjustierung wurden bei jedem Tier eine Protonen- und T2-Bildgebung, sowie eine arterielle Angiographie durchgeführt.

Im Anschluss an die Kernspintomographie erfolgten die Tötung der Tiere und die Aufarbeitung der Gehirne zur TTC-Färbung.

2.2.4. Ausschlusskriterien

Vor dem Beginn der Experimente wurden folgende Ausschlusskriterien festgelegt:

- Fehlen fokalneurologischer Defizite 3 Stunden nach Verschluss der A. cerebri media
- MR-angiographisch nachgewiesener Verschluss des A. cerebri media-Hauptstammes nach 24 Stunden in der Reperfusionsgruppe (Gruppe I)

- Fehlende Okklusion des A. cerebri media-Hauptstammes auf der Angiographie nach 24 Stunden in den permanenten Okklusionsgruppen (Gruppe II und III)
- Fehlender Nachweis eines Infarktes im Versorgungsgebiet der A. cerebri media auf der T2- und Protonen-gewichteten Sequenz und in der TTC-Färbung
- Nachweis von Blutungskomplikationen in der Bildgebung oder bei der postmortalen Inspektion

Alle ausgeschlossenen Tiere wurden ersetzt.

2.2.5. Bestimmung von Infarktgröße und Gefäßverschlüssen

Die Infarkt volumina wurden anhand der MRT-Bildgebung und zusätzlich an den TTC-gefärbten Präparaten bestimmt.

Auf den T2-gewichteten Bildgebungen stellten die hellen, echoreichen Gebiete die Infarkt areale dar. Unter Verwendung einer Bildanalyse-Software (Image J 1,25s; National Institutes of Health, USA) wurden die Größen der beiden Hemisphären und des gesamten Infarktgebietes für jede coronare Schicht gemessen. Der prozentuale Anteil des Läsionsvolumens (%HLV) wurde berechnet und für den raumfordernden Effekt des Hirnödems korrigiert. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\%HLV_e = ((HV_c - HV_i + LV) / HV_c) \cdot 100,$$

wobei LV das direkte Läsionsvolumen, HV_i das ipsilaterale Hemisphärenvolumen und HV_c das contralaterale Hemisphärenvolumen darstellt. Beide Volumina wurden durch eine Multiplikation aller Schichten mit 2mm (Schichtdicke) und einer anschließenden Addition errechnet.⁵⁴

Mit Hilfe der arteriellen Angiographie wurde die A. cerebri media auf einen Gefäßverschluss untersucht.

2.2.6. Datenanalyse und statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte nach den vorher beschriebenen Verfahren.

2.3. Experiment III: Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Kernspintomographen („In-bore-Okklusion“)

2.3.1. Ziel

Durch dieses Experiment sollte gezeigt werden, inwieweit sich das Makrosphärenmodell zur so genannten In-bore-Okklusion, d.h. zum Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Kernspintomographen eignet. Ferner sollte die Ausbreitung des vasogenen und des zytotoxischen Hirnödems innerhalb der ersten Minuten des Hirninfarkts untersucht werden.

2.3.2. Versuchsgruppeneinteilung

Neun Tiere wurden einem Verschluss der A. cerebri media mit dem Makrosphärenmodell unterzogen. Ergänzend wurde eine Kontrollgruppe von fünf Tieren in der gleichen Weise operiert, allerdings wurden keine Makrosphären, sondern nur heparinisierte Kochsalzlösung eingespült (sham-procedure).

2.3.3. Studienablauf

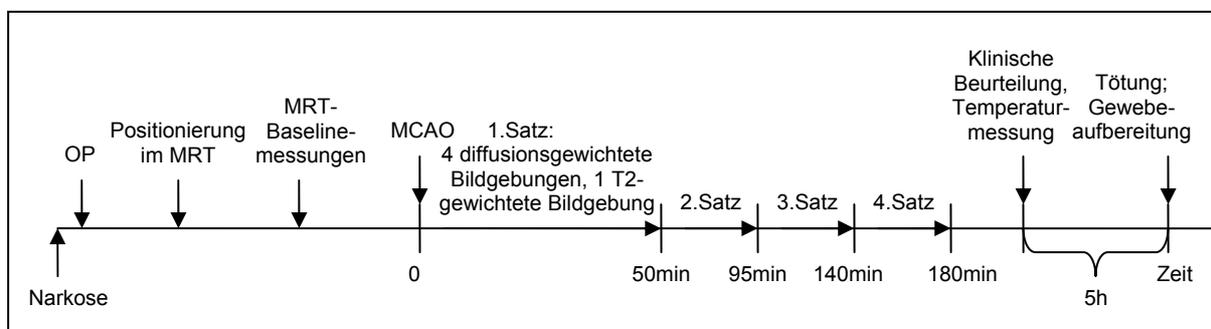


Abb.23: Studienablauf

In dieser Studie wurde ein modifiziertes Makrosphärenmodell verwendet. Dabei wurde die rechte A. carotis communis und die A. carotis externa an ihrem Ursprung aus der A. carotis communis permanent ligiert. Nach dem Schließen der temporären Ligatur der A. carotis interna wurde die A. carotis communis arteriotomiert. In diese Arterie wurde nun ein Katheter (Innendurchmesser: 0,58mm, Außendurchmesser: 0,965mm), der zuvor mit heparinisierter 0,9%iger Kochsalzlösung und 6 Makrosphären gefüllt wurde, tief in die A. carotis interna eingeführt und bis rostral des Abgangs der A. pterygopalatina vorgeschoben, wo er dann mit mehreren Ligaturen fixiert wurde. Im Anschluss erfolgten das Entfernen aller transienten

Ligaturen und der Verschluss der Wunde mit einer fortlaufenden Hautnaht. Die Körperkerntemperatur, der arterielle Blutdruck und die Blutgase wurden am Ende der Operation gemessen. Nach der Positionierung und Feinjustierung im Magnetresonanztomographen wurden vor Ischämieinduktion eine diffusions- und eine T2-gewichtete Bildgebung durchgeführt, die als Baseline-Messung diente.

Im Anschluss wurden die Makrosphären in die A. carotis interna eingespült. In der Kontrollgruppe wurden keine Makrosphären, sondern nur heparinisierte Kochsalzlösung eingespült.

Die diffusionsgewichtete Bildgebung wurde unmittelbar nach Ischämiebeginn (Injektion der Makrosphären) und danach zu den Zeitpunkten 5, 10 und 15 Minuten nach Injektion durchgeführt. Diesen Messungen folgte eine T2-Bildgebung. Dieses Vorgehen (4 diffusionsgewichtete Sequenzen, gefolgt von einer T2-gewichteten Bildgebung) wurde im Anschluss dreimal wiederholt.

Nach Verlassen des Kernspintomographen wurde der Katheter entfernt, die A. carotis communis ligiert und die Wunde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die Körperkerntemperatur wurde bis zum vollständigen Erwachen der Tiere reguliert. 5 Stunden nach Ischämieinduktion wurden die Tiere neurologisch untersucht und anschließend getötet. Die Position der Makrosphären in den basalen Hirnarterien wurde durch Inspektion unter dem Operationsmikroskop ermittelt.

2.3.4. Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden nur solche Tiere, bei denen ein Infarkt im Versorgungsgebiet der A. cerebri media nachweisbar war. Tiere, die in den ersten 5 Stunden nach MCA-Verschluss verstarben wurden ausgeschlossen.

2.3.5. Bestimmung der Infarktvolumen, des ADC und der T2-Relaxationszeit

Die Infarktvolumina wurden anhand von ADC-maps der zuletzt gewonnenen diffusionsgewichteten Bilder ermittelt. Die Grenzen der Läsionen und des gesamten Gehirns wurden manuell auf jeder der 6 koronaren Schichten bestimmt. Die jeweiligen Gebiete wurden summiert und mit der Schichtdicke (2mm) multipliziert. Die Läsionsvolumina wurden in Prozent der Hemisphäre durch folgende Gleichung ermittelt: $\%HLV = LV \times 100 / (BV/2)$. In dieser Gleichung steht LV für das Läsionsvolumen und BV für das gesamte Gehirnvolumen.

ADC und T2-Relaxationszeit wurden in regions of interest (ROI) unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware ermittelt. Die Positionierung der ROI wurde auf den 150 Minuten nach Infarktinduktion erstellten ADC-maps festgelegt. Auf jeder Schicht, auf der eine ischämische Läsion aufzufinden war, wurde eine ROI im Zentrum des kortikalen und subkortikalen Anteils der Läsion platziert. In der Kontrollgruppe wurden die ROI im Kortex und Subkortex auf den Schichten drei und fünf an den Punkten platziert, wo die ischämischen Läsionen typischer Weise nach Infarktinduktion zu finden waren. Zusätzliche ROI wurden jeweils auf der contralateralen Hemisphäre an korrespondierenden Positionen platziert. Schichten ohne ischämische Läsion wurden nicht berücksichtigt. Die Mittelwerte der ADC-Werte aller kortikalen und subkortikalen ROI wurden für beide Hemisphären ermittelt. ADC wurde dann in gleicher Weise auf den Bildern der früheren Zeitpunkte gemessen, wobei die ROI-Positionen nicht verändert wurden. Die Quantifizierung der T2-Relaxationszeit wurde unter Verwendung der gleichen ROI-Positionen wie bei der ADC-Quantifizierung vorgenommen.

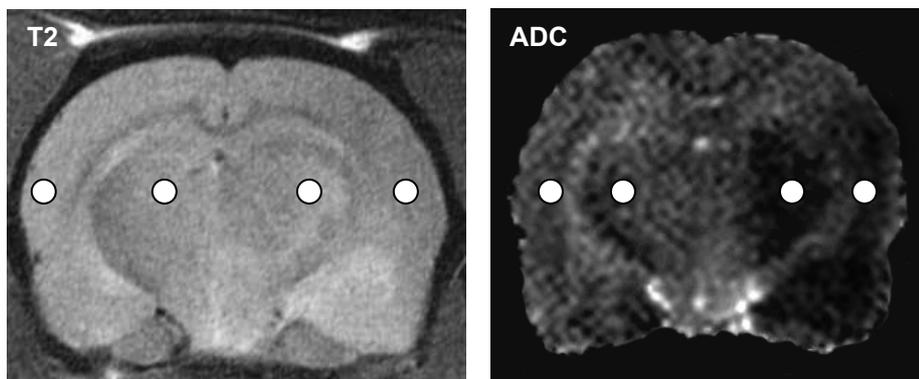


Abb.24: Die Positionierung der ROI erfolgte auf den ADC-Bildern (rechts) jeweils im Zentrum des kortikalen und des subkortikalen Infarktanteils und an korrespondierenden Positionen auf der Gegenseite. Auf den T2-Bildern wurden die ROI an gleicher Position platziert.

2.3.6. Datenanalyse und statistische Auswertung

Um die Veränderungen des ADC und der T2-Relaxationszeit über die Zeit in den kortikalen und subkortikalen Regionen der ischämischen Läsionen zu bestimmen, wurden die Seitendifferenzen zwischen beiden Hemisphären an jedem Zeitpunkt ermittelt.

Die nachfolgende statistische Auswertung erfolgte wie unter III.1.8. beschrieben. Im Anschluss wurde für jede Gruppe der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung des ADC und der T2-Relaxationszeit gegen die Zeit aufgetragen.

IV. Ergebnisse

1. Experiment I: Neuroprotektionsstudie mit Dizocilpin

1.1. Ausschlussrate

Im Rahmen dieser Studie mussten 19 Tiere entsprechend der vorformulierten Ein- und Ausschlusskriterien ausgeschlossen und ersetzt werden, die meisten davon in Gruppe III (siehe Tab. 2).

	Gruppe I Fadenmodell (mit Hypothalamusinfarkt)		Gruppe II Makrosphärenmodell (ohne Hypothalamusinfarkt)		Gruppe III Makrosphärenmodell (mit Hypothalamusinfarkt)	
	Placebo	Dizocilpin	Placebo	Dizocilpin	Placebo	Dizocilpin
Subarachnoidal- blutung		2				
Intrazerebrale Blutung			1			1
Kein Infarkt	1		1	1	1	1
Hypothalamus- infarkt			1			
Kein Hypothalamus- infarkt	1	1			3	4
Σ	2	3	3	1	4	6

Tab.2: Ausschlussgründe und Anzahl der ausgeschlossenen Tiere

1.2. Physiologische Parameter

Bei dem Vergleich der physiologischen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

Gruppe	Okklusionsmodell	Substanzgabe	Gewicht (g)	Arterieller Mitteldruck (mmHg)		PaO ₂ (mmHg)		PaCO ₂ (mmHg)		pH	
				Vor MCAO	15 min. nach MCAO	Vor MCAO	15 min. nach MCAO	Vor MCAO	15 min. nach MCAO	Vor MCAO	15 min. nach MCAO
I	Fadenmodell (mit Hypothalamusinfarkt)	Dizocilpin	316 ±17	89,8 ±6,9	94,6 ±11,4	88,8 ±9,6	86,0 ±10,3	39,5 ±2,6	37,5 ±6,4	7,42 ±0,03	7,43 ±0,05
		Placebo	316 ±18	96,1 ±7,3	95,9 ±6,9	86,6 ±6,2	88,8 ±16,8	39,9 ±2,9	39,8 ±4,3	7,41 ±0,03	7,41 ±0,05
II	Makrosphärenmodell (ohne Hypothalamusinfarkt)	Dizocilpin	317 ±20	90,3 ±5,4	89,3 ±11,0	81,8 ±6,0	77,6 ±7,2	43,1 ±3,2	44,3 ±3,8	7,38 ±0,04	7,37 ±0,05
		Placebo	314 ±20	92,4 ±8,9	86,7 ±9,2	82,2 ±5,9	72,9 ±3,1	42,2 ±4,0	47,3 ±1,9	7,40 ±0,04	7,36 ±0,03
III	Makrosphärenmodell (mit Hypothalamusinfarkt)	Dizocilpin	313 ±23	76,4 ±9,7	83,4 ±11,6	94,9 ±14,2	86,3 ±13,2	40,1 ±2,0	40,2 ±6,2	7,42 ±0,02	7,42 ±0,05
		Placebo	295 ±26	73,9 ±6,7	79,8 ±10,9	87,5 ±12,6	81,0 ±5,3	37,9 ±5,3	38,4 ±5,8	7,42 ±0,03	7,42 ±0,04

Tab.3: Physiologische Parameter dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen ($p > 0,05$)

Lediglich bei der Körperkerntemperatur zeigte sich in Gruppe I und Gruppe III (mit Hypothalamusinfarkt) ein signifikanter Anstieg, während die Tiere in Gruppe II (keine Hypothalamusschädigung) während des gesamten Versuchsablauf normotherm blieben.

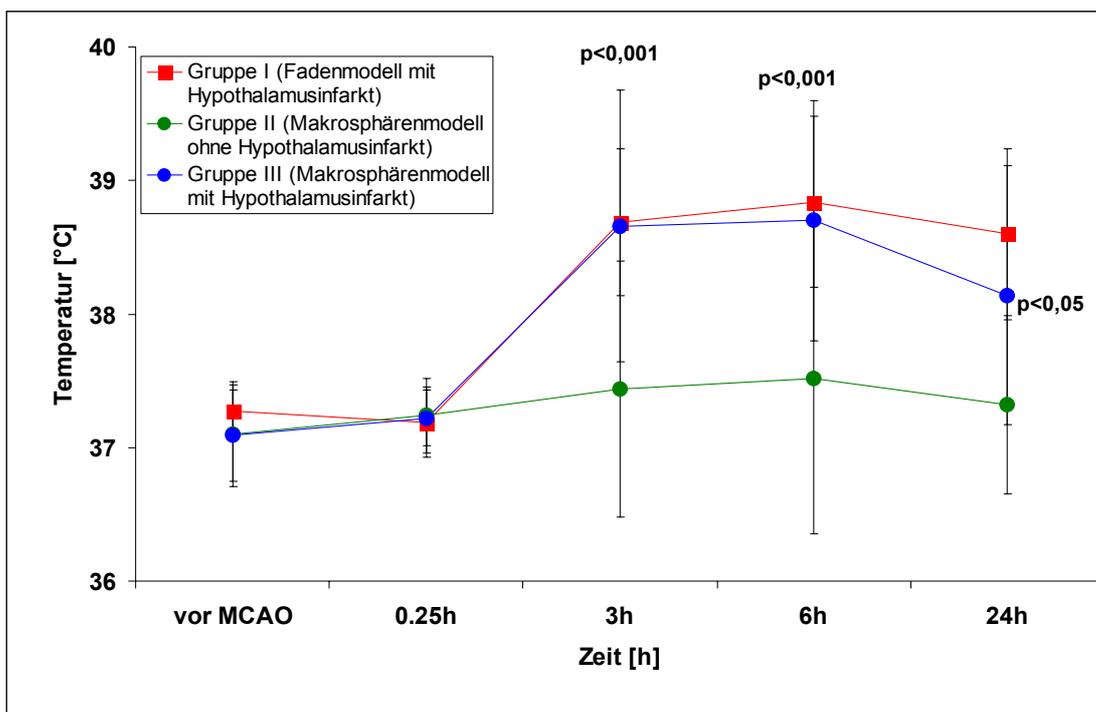


Abb.25: Temperaturverlauf der drei Versuchsgruppen im Vergleich. Es zeigte sich in den Gruppen I und III nach 3h und 24h ein hoch signifikanter Anstieg der Körperkerntemperatur. Dies war in der Gruppe II nicht zu beobachten.

1.3. Klinische Befunde

Alle Tiere erwachten 5 bis 15 Minuten nach Ende der Narkose. 15 Tiere starben zwischen 6 und 24 Stunden nach der Okklusion. Diese Tiere wurden nicht ausgeschlossen, da die Qualität der TTC-Färbung ausreichte, um die Infarktgröße zu bestimmen. Die Tiere, die mit Dizocilpin behandelt wurden, zeigten 3 und 6 Stunden nach Ischämieinduktion eine schwere Ataxie. 24 Stunden nach Infarktinduktion stabilisierte sich das klinische Bild dieser Tiere, während die neurologische Beurteilung der nicht behandelten Tiere schlechter wurde. Zu diesem Zeitpunkt gab es einen nicht-signifikanten Trend bezüglich eines besseren klinisch-neurologischen Outcome der mit Dizocilpin behandelten Ratten in den Makrosphärengruppen, während die Ergebnisse der behandelten und unbehandelten Tiere in der Fadenmodellgruppe identisch waren.

Gruppe	Medikament	Klinischer Score			Mortalitätsrate
		3h	6h	24h	
I	Placebo	2	2	2	10%
		(1-2)	(1-2)	(2-5)	
	Tukey-Kramer-Test	p< 0,001	p< 0,001	p=0,95	
	Dizocilpin	3	3	2	10%
(3-3)		(3-3)	(1-5)		
II	Placebo	2	2	2	30%
		(1-2)	(1-2)	(1-5)	
	Tukey-Kramer-Test	p< 0,01	p< 0,01	p=0,42	
	Dizocilpin	3	3	1,5	20%
(2-3)		(1-3)	(1-5)		
III	Placebo	2	2	3,5	50%
		(1-2)	(1-2)	(2-5)	
	Tukey-Kramer-Test	p<0,01	p<0,01	p=0,87	
	Dizocilpin	3	3	3	30%
(3-3)		(3-3)	(3-5)		

Tab.4: Klinische Beurteilung der 3 Versuchsgruppen (je 20 Tiere) angegeben als Median und Spannweite, Ergebnisse des Tukey-Kramer-Tests und die Mortalitätsrate in den 3 Versuchsgruppen

1.4. Post-mortem Befunde

Nach Entnahme des Gehirns ließ sich die Lokalisation der Makrosphären in den basalen Hirnarterien durch Inspektion bestimmen. Bei allen eingeschlossenen Tieren führten die Makrosphären zu einem direkten Verschluss der A. cerebri media oder

fürten durch Blockade der distalen A. carotis interna und der A. communicans posterior zu einem funktionellen Verschluss. In Gruppe III fand sich (bedingt durch die erhöhte Anzahl embolisierter Sphären) ein langstreckiger Verschluss der distalen A. carotis interna, wodurch der Abgang der A. hypothalamica mit verschlossen wurde.

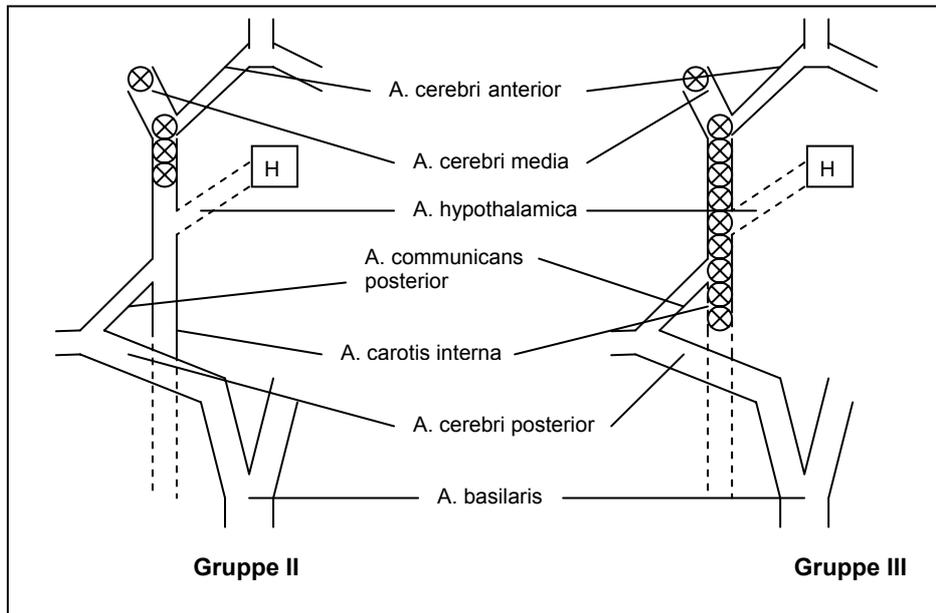


Abb.26: Schematische Zeichnung der Lage der Makrosphären in den basalen Hirnarterien. In Gruppe III fanden sich die Sphären perlschnurartig in der distalen A. carotis interna aufgereiht und führten so zu einem Verschluss des Abgangs der A. hypothalamica. ⊗= Makrosphäre, H= Hypothalamus

In den Gruppen I und III wurde anhand der TTC-Färbung bei allen Tieren ein Hypothalamusinfarkt nachgewiesen. Bei den Tieren dieser beiden Gruppen konnte (durch den Vergleich Dizocilpin-behandelter Tiere mit der Placebogruppe) kein signifikanter neuroprotektiver Effekt von Dizocilpin nachgewiesen werden ($p > 0.05$). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Gruppe II ein hochsignifikanter neuroprotektiver Effekt. Dieser äußerte sich in einer etwa 60%-igen Reduktion der gesamten, der kortikalen und der subkortikalen Läsionsvolumina.

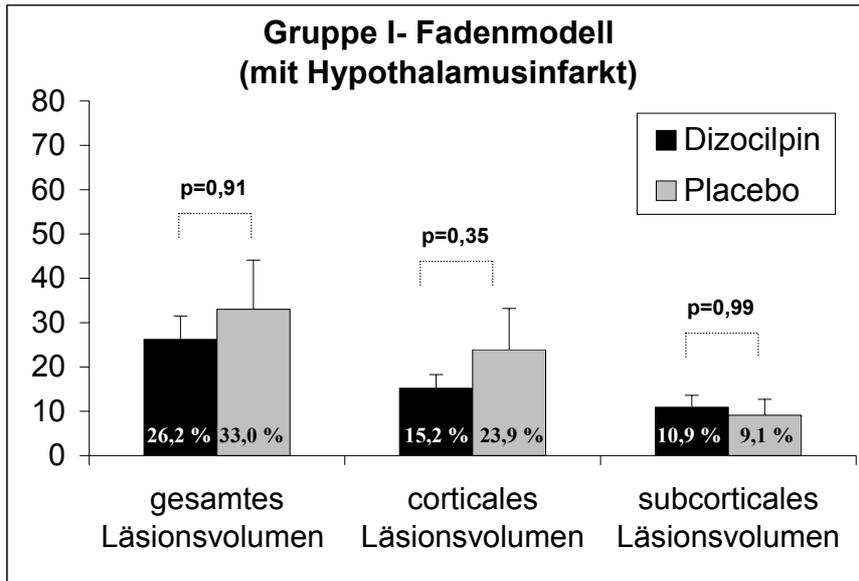
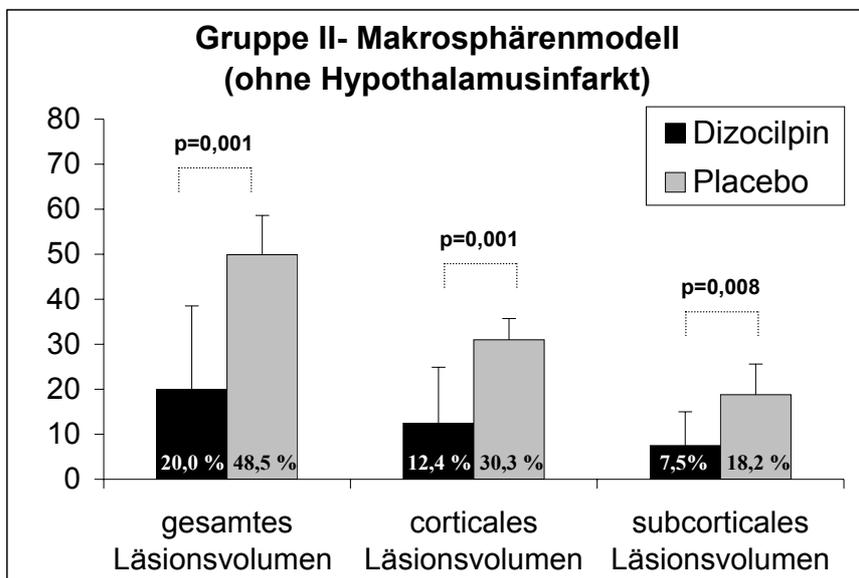


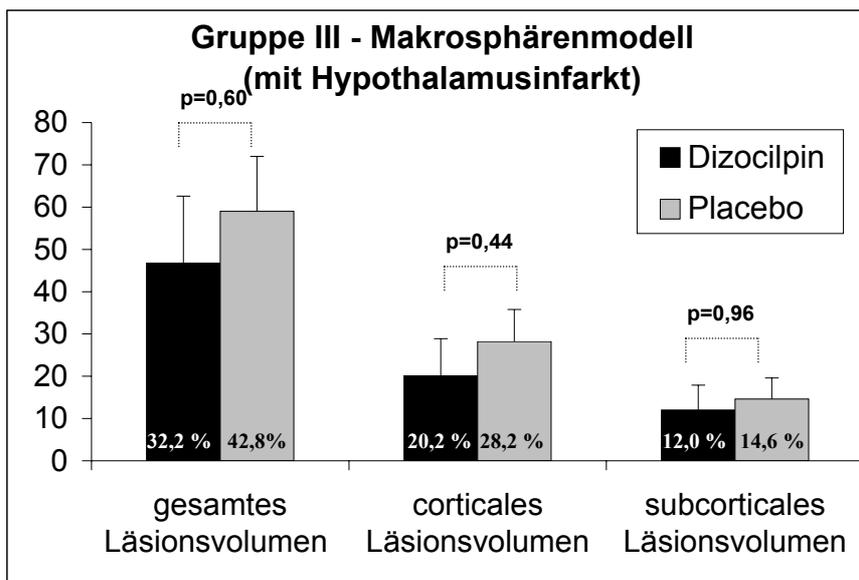
Abb.27: Die Läsionsvolumina der 3 Versuchsgruppen im Vergleich:

Oben: Die Verwendung des Fadenmodells führte bei allen Tieren zu einem Hypothalamusinfarkt und einer pathologischen Hyperthermie. Dizocilpin führte zu keinem signifikanten neuropotenten Effekt.

Mitte: Durch die Verwendung des Makrosphärenmodells wurden Hypothalamuschädigungen und eine pathologische Hyperthermie vermieden. Dizocilpin führte zu einer hochsignifikanten Reduktion der kortikalen und subkortikalen Infarktareale.



Unten: Bei Verwendung des modifizierten Makrosphärenmodells wurden durch eine erhöhte Anzahl an Sphären die typischen Nebenwirkungen des Fadenmodells (Hypothalamusinfarkte und Hyperthermie) hervorgerufen. Unter diesen Bedingungen entfaltete Dizocilpin keine signifikante Reduktion der Infarktgröße.



Das Vorhandensein eines Hypothalamusinfarktes, wobei die Ergebnisse der Gruppen I und III zusammengefasst wurden, korrelierte signifikant mit der Körperkerntemperatur bei 3 Stunden ($r=0.55$; $p<0.001$), 6 Stunden ($r=0,58$; $p<0,001$) und 24 Stunden ($r=0,57$; $p<0,001$) nach Ischämieinduktion, aber nicht mit der Temperatur während der Anästhesie vor Ischämieinduktion ($r=0,08$; $p=0,53$) und 15 Minuten nach Ischämieinduktion ($r =-0,11$; $p=0,4$).

2. Experiment II: Vergleich der Komplikationen des Faden- und Makrosphärenmodells

2.1. Pilotstudie

In der Pilotstudie konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der physiologischen Parameter zwischen den Modellen festgestellt werden (siehe Tab.5).

2.2. Hauptstudie

2.2.1. Körperkerntemperatur

In den Gruppen I (Fadenmodell-Reperfusion) und III (Makrosphärenmodell-permanente Ischämie) blieb die Körperkerntemperatur im physiologischen Bereich (im Mittel $37,32^{\circ}\text{C}$), während sich ein signifikanter Anstieg der Temperatur in der Gruppe II (Fadenmodell-permanente Ischämie) zeigte ($p<0,01$).

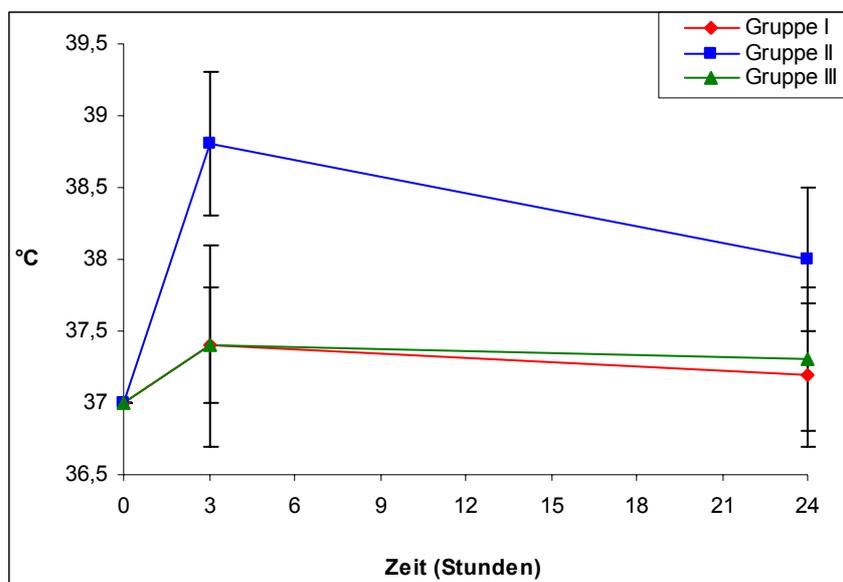


Abb.28: Verlauf der Körperkerntemperatur: In Gruppe I (Fadenmodell, 90-minütige Ischämie) und in Gruppe III (permanenter MCA-Verschluss mit dem Makrosphärenmodell) blieb die Körperkerntemperatur im physiologischen Bereich. Bei Verwendung des Fadenmodells zum permanenten MCA-Verschluss (Gruppe II) kam es zu einem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur

Gruppe	Okklusions- modell	Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)			PaO ₂ (mmHg)			PaCO ₂ (mmHg)			pH			Glucose (mg/dl)		
		Vor MCAO	10 min. nach MCAO	100 min. nach MCAO	Vor MCAO	10 min. nach MCAO	100 min. nach MCAO	Vor MCAO	10 min. nach MCAO	100 min. nach MCAO	Vor MCAO	10 min. nach MCAO	100 min. nach MCAO	Vor MCAO	10 min. nach MCAO	100 min. nach MCAO
I	Faden- reperfusion- modell	81,4 ±13,0	87,3 ±9,0	83,9 ±7,9	97,0 ±12,3	94,9 ±3,5	85,5 ±5,7	31,1 ±4,4	33,2 ±5,8	35,5 ±6,4	7,42 ±0,02	7,45 ±0,04	7,43 ±0,04	150 ±13	121 ±21	150 ±24
II	Permanentes Fadenmodell	87,0 ±5,3	84,0 ±8,8	87,6 ±8,6	77,0 ±12,7	100,1 ±6,4	93,8 ±9,4	41,7 ±4,8	31,5 ±4,4	40,0 ±10,9	7,38 ±0,05	7,48 ±0,04	7,46 ±0,03	171 ±25	144 ±35	150 ±25
III	Makrosphären- modell	86,4 ±10,1	85,7 ±10,3	85,2 ±8,1	76,1 ±14,6	87,7 ±3,0	77,3 ±4,5	43,1 ±7,9	37,6 ±2,7	38,3 ±1,8	7,37 ±0,06	7,41 ±0,02	7,40 ±0,01	188 ±27	147 ±27	178 ±35

Tab. 5: Physiologische Parameter der Pilotstudie. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

2.2.2. Klinisch-neurologischer Befund

Alle Tiere erwachten 5 bis 10 Minuten nach Beendigung der Operation.

Der klinische Score lag bei allen Tieren der drei Gruppen sowohl 3 Stunden als auch 24 Stunden nach Infarktinduktion zwischen 1 und 4 und unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ($p>0,05$).

Gruppe	Klinische Beurteilung	
	3h	24h
I	1 (1-4)	2 (1-3)
	1,9±1,2	2,1±1,0
II	2 (1-3)	2 (1-3)
	2,1±0,9	1,9±0,9
III	2 (1-3)	2 (1-3)
	2,0±1,1	2,0±1,1

Tab.6: Klinische Beurteilung der 3 Versuchsgruppen (je 10 Tiere) angegeben als Median und Spannweite sowie als Mittelwert +/- Standardabweichung ($p>0,05$).

2.2.3. Kernspintomographische Befunde

2.2.3.1. T2-gewichtete Bildgebung

Die ischämischen Läsionen waren auf dieser Bildgebung 24 Stunden nach Ischämieinduktion deutlich sichtbar.



Abb.29: T2-gewichtete Bildgebung. Der weiße Bereich der rechten Hemisphäre stellt das Infarktareal im Versorgungsgebiet der A. cerebri media dar. Die Mittellinienverlagerung ist deutlich zu erkennen.

In der Gruppe II (permanentes Fadenmodell) wurde bei allen Tieren eine Hypothalamusschädigung nachgewiesen. In Gruppe I (Reperusionsmodell) und Gruppe III (Makrosphärenmodell) traten keine Hypothalamusinfarkte auf.

Das mittlere Ödem-korrigierte Läsionsvolumen lag bei den Tieren der Gruppe I (Reperusionsmodell) bei 14,6% ($\pm 12,4$), der Gruppe II (permanentes Fadenmodell) bei 35,2% ($\pm 11,4$) und bei den Tieren der Gruppe III (Makrosphärenmodell) bei 21,3% ($\pm 17,2$). Die mittlere Läsionsgröße war in der Reperusionsgruppe (Gruppe I) im Vergleich zu Gruppe II (permanentes Fadenmodell) ($p < 0,01$) und Gruppe III (Makrosphärenmodell) ($p < 0,05$) signifikant kleiner. Die Tiere in Gruppe III (Makrosphärenmodell), zeigten im Vergleich zu Gruppe II ein etwas kleineres Läsionsvolumen. Diese Differenz war statistisch jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

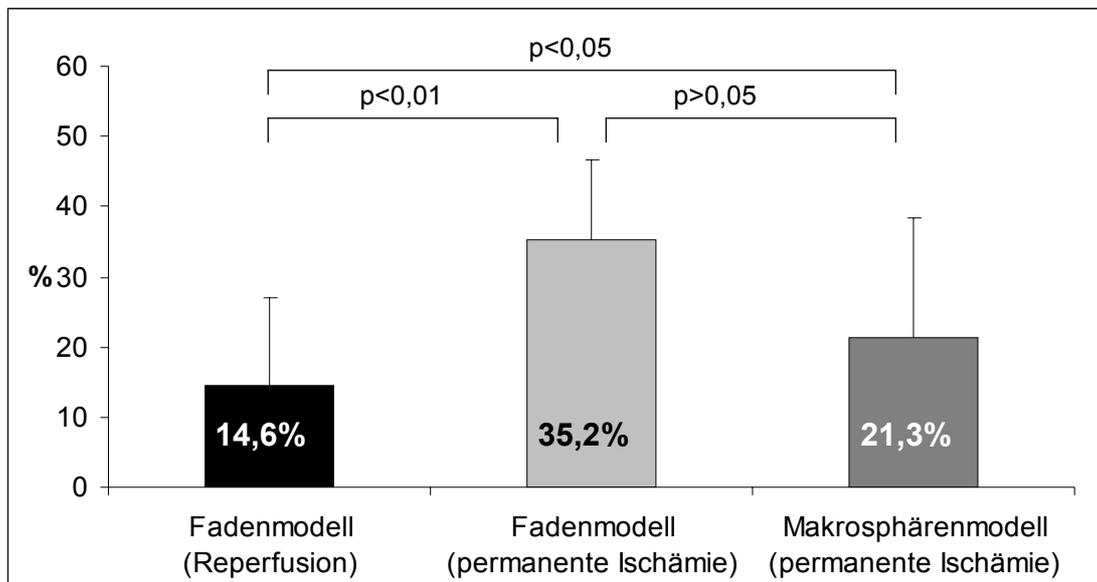


Abb.30: Läsionsvolumina (gemessen anhand der T2-gewichteten MRT-Bildgebung).

2.2.3.2. Arterielle MR-Angiographie

Die arterielle MR-Angiographie ermöglicht die Darstellung der großen basalen Hirnarterien. Diese Methode wurde eingesetzt, um den Verschluss der A. cerebri media (durch den Faden bzw. durch Makrosphären) bzw. die Reperfusion (durch Entfernung des Fadens) zu überprüfen. Bei allen Tieren gelang eine zur Beurteilung der A. cerebri media ausreichende Gefäßdarstellung. Der Verschluss der jeweiligen Gefäße äußert sich ebenfalls in den T2-gewichteten Bildgebungen. Dabei erzeugt ein arterieller Verschluss eine Infarzierung des zugehörigen Versorgungsgebietes.

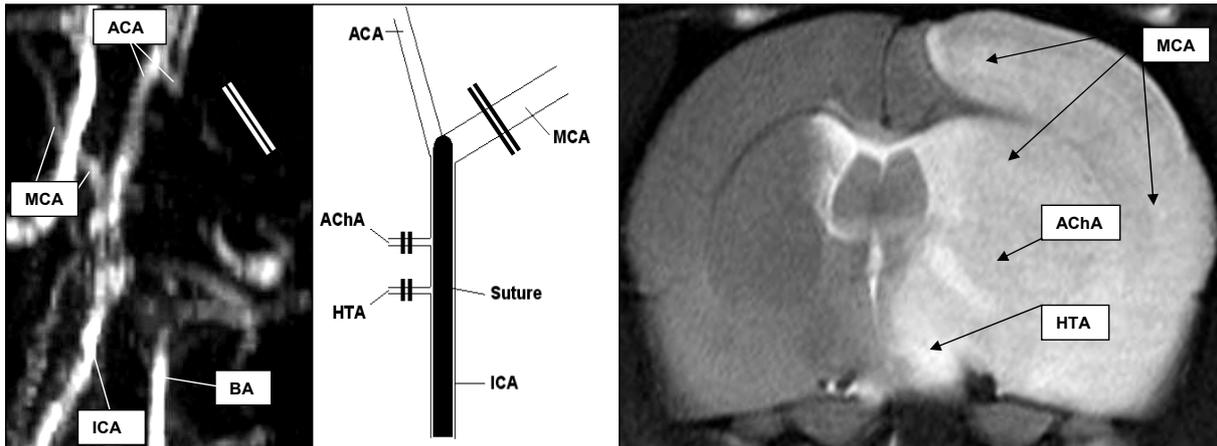


Abb.31: Verschluss der A. cerebri media mit dem permanenten Fadenmodell: MR-Angiographie (links), Schemazeichnung (Mitte) und T2-gewichtetes MRT (rechts) (weißer Bereich=Infarkt).

Angiographisch (links) konnte der Verschluss der A. cerebri media nachgewiesen werden. In der T2-gewichteten Bildgebung (rechts) wird eine Infarzierung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media aber auch im Stromgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica deutlich. MCA=A. cerebri media; ACA=A. cerebri anterior; ICA= A. carotis interna; BA= A. basilaris; AChA=A. choroidea anterior; HTA=A. hypothalamica

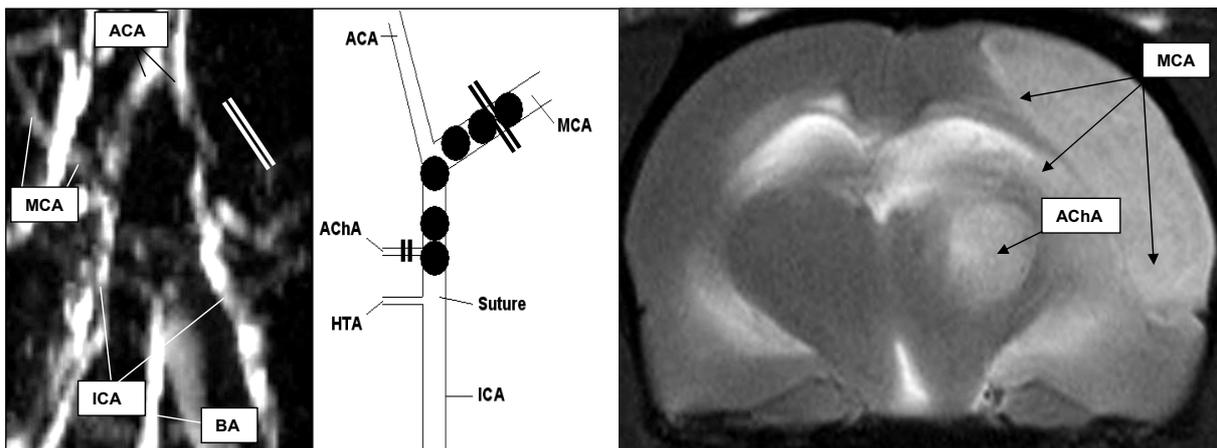


Abb.32: Verschluss der A. cerebri media mit dem Makrosphärenmodell: Angiographie (links), Schemazeichnung (Mitte) und T2-gewichtetes MRT (rechts) (weißer Bereich=Infarkt) Angiographisch (links) konnte der Verschluss der A. cerebri media und der A. choroidea anterior nachgewiesen werden. In der T2-gewichteten Bildgebung (rechts) wird eine Infarzierung im Versorgungsgebiet der A. cerebri media, aber auch im Stromgebiet der A. choroidea anterior deutlich. Dagegen ist das Versorgungsgebiet der A. hypothalamica nicht infarziert.

MCA=A. cerebri media; ACA=A. cerebri anterior; ICA= A. carotis interna; BA= A. basilaris; AChA=A. choroidea anterior; HTA=A. hypothalamica

2.2.4. Histopathologische Befunde

Zur Kontrolle wurden die Ödem-korrigierten Infarkt volumina auch anhand der TTC-Färbungen quantifiziert. Die mittlere Infarktgröße betrug in Gruppe I 19,0% ($\pm 14,7$), in Gruppe II 39,7% ($\pm 18,2$) und in der Gruppe III 26,8% ($\pm 18,7$). Die anhand der TTC-Färbung ermittelten Volumina korrelierten gut mit den Ergebnissen der MRT-Messungen ($r=0.84$; $p<0,01$; $n=30$).

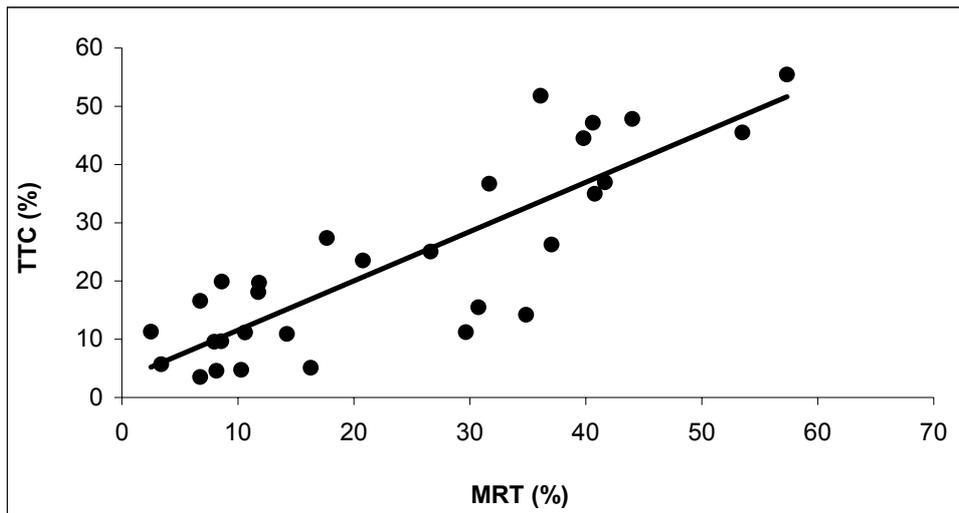


Abb.33: Korrelation der anhand der TTC-Färbung und der MRT-Bildgebung quantifizierten Läsionsvolumina. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,84$ ($p < 0,01$)

2.2.5. Modellversagerquote und Fehlerquellen

Im Verlauf dieser Studie mussten 7 Tiere aufgrund unterschiedlicher Komplikationen ausgeschlossen und ersetzt werden: Zwei Ratten (ein Tier in Gruppe II und eines in Gruppe III) zeigten 3 Stunden nach Ischämieinduktion keine neurologischen Defizite. Mit Hilfe der TTC-Färbung nach 24 Stunden konnte keine fokale zerebrale Ischämie nachgewiesen werden. In der postmortalen Inspektion zeigte sich bei einem Tier in der Makrosphärengruppe eine anatomische Variante mit einem doppelt angelegten A. cerebri media-Hauptstamm. Hier wurde nur der proximale Anteil verschlossen. Eine Perfusion des MCA-Versorgungsgebietes erfolgte über den distalen Hauptstamm („Crossflow“ von der Gegenseite).

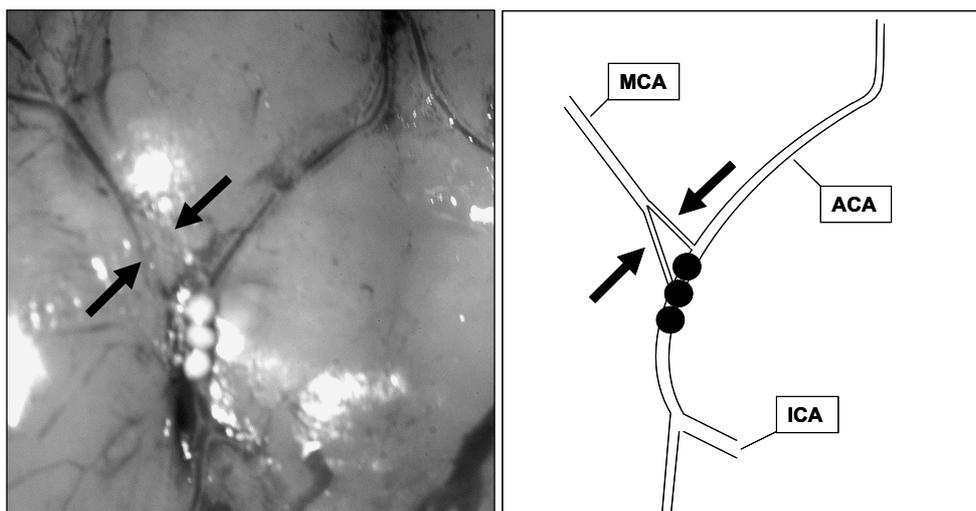


Abb.34: Doppelt angelegter A. cerebri media-Hauptstamm (Normvariante) als mögliche Fehlerquelle des Makrosphärenmodells: Die Makrosphären blockierten lediglich den proximalen, nicht jedoch den distalen Anteil des MCA-Hauptstammes. Klinisch: Normalbefund. Kein Infarktnachweis in der TTC-Färbung. MCA=A. cerebri media; ICA=A. carotis interna; ACA=A. cerebri anterior

Bei der postmortalen Inspektion wurden bei zwei Tieren (je ein Tier in Gruppe I und II) subarachnoidale Blutungskomplikationen gefunden.

Bei zwei Tieren der Gruppe II (permanentes Fadenmodell) zeigte sich MR-angiographisch ein offener A. cerebri media-Hauptstamm obgleich beide Ratten fokalneurologische Defizite (Score 2 bzw. 1) aufwiesen. Bei diesen Tieren wurde eine kleine subkortikale ischämische Läsion auf den T2-gewichteten MRT-Bildern diagnostiziert, was für einen Infarkt im Versorgungsgebiet der A. choroidea anterior spricht.

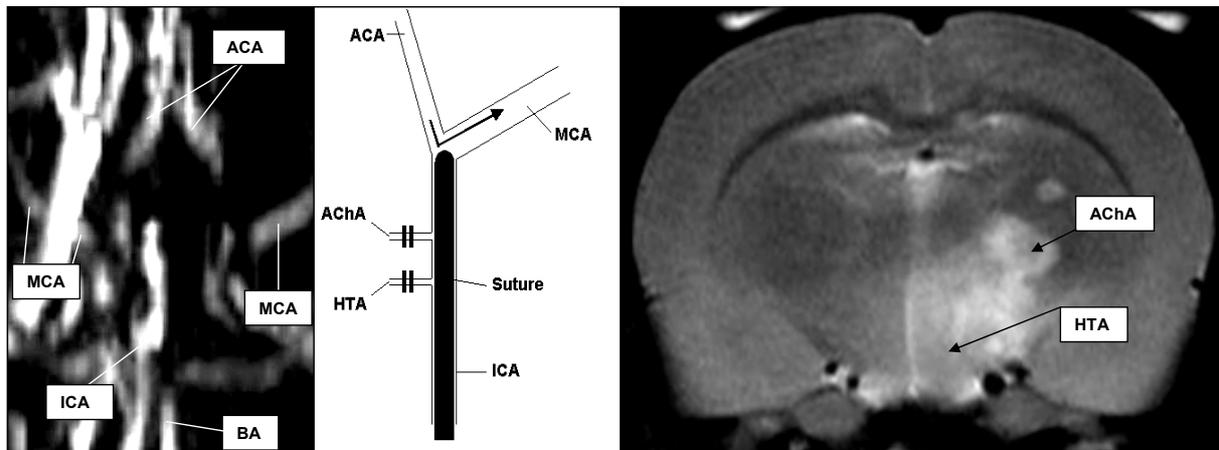


Abb.35: Typische Fehlerquelle des Fadenmodells: Die MR-Angiographie (links) belegt, dass der MCA-Hauptstamm nicht verschlossen war. Dennoch zeigte dieses Tier fokalneurologische Defizite. Ursächlich ist ein Infarkt im Versorgungsgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica (sichtbar auf dem T2-gewichteten MRT rechts). Die Schemazeichnung (Mitte) verdeutlicht die Fehllage des Okkluders: Der Faden wurde nicht ausreichend weit vorgeschoben und führte zu einem Verschluss der beiden Äste aus der A. carotis interna, nicht jedoch zu dem angestrebten MCA-Hauptstammverschluss.

MCA=A. cerebri media; ACA=A. cerebri anterior; ICA= A. carotis interna; BA= A. basilaris; AChA=A. choroidea anterior; HTA=A. hypothalamica

Ein Tier der Gruppe II (permanentes Fadenmodell) zeigte zusätzlich eine ischämische Läsion im Versorgungsgebiet der A. hypothalamica mit daraus resultierender Hyperthermie.

	Score	Befund der arteriellen Angiographie	Befund der T2-gewichteten Sequenz	Postmortale Inspektion	Temperatur	Befund der TTC-Färbung
Gruppe I (Fadenreperfusion)	1	Kein Verschluss der MCA	Läsion im Stromgebiet der MCA	Subarachnoidale Hämorrhagie*)	Normal	Läsion im Stromgebiet der MCA
Gruppe II (Fadenmodell-permanent)	2	Kein Verschluss der MCA*)	Kleine Läsion, die typisch ist für einen Infarkt im Stromgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica	Normal	Hyperthermie	Kleine Läsion, die typisch ist für einen Infarkt im Stromgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica
	1	Kein Verschluss der MCA*)	Kleine Läsion, die typisch ist für einen Infarkt im Stromgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica	Normal	Hyperthermie	Kleine Läsion, die typisch ist für einen Infarkt im Stromgebiet der A. choroidea anterior und der A. hypothalamica
	3	Verschluss der MCA	Läsion im Stromgebiet der MCA	Subarachnoidale Hämorrhagie*)	Normal	Läsion im Stromgebiet der MCA
	0*)	Kein Verschluss der MCA	Keine ischämische Läsion	Normal	Normal	Keine ischämische Läsion
Gruppe III (Makrosphärenmodell-permanent)	3	Verschluss der MCA	Läsion im Stromgebiet der MCA und der A. hypothalamica*)	Makrosphären okkludierten den proximalen Anteil der ICA und den Ursprung der MCA	Hyperthermie	Läsion im Stromgebiet der MCA und der A. hypothalamica*)
	0*)	Kein Verschluss der MCA	Keine ischämische Läsion	Doppelter MCA-Hauptstamm; Makrosphären okkludierten nur einen Hauptstamm	Normal	Keine ischämische Läsion

Tab.7: Übersicht aller Komplikationen

MCA=A. cerebri media; ICA= intrakranieller Anteil der A. carotis interna; *)=Ausschlussgrund

3. Experiment III: Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Kernspintomographen („In-bore-Okklusion“)

3.1. Physiologische Parameter

Der arterielle Blutdruck, die Körperkerntemperatur, der O₂-Partialdruck, der CO₂-Partialdruck und der pH-Wert bewegten sich innerhalb physiologischer Grenzen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Makrosphären-Gruppe vs. Kontrollgruppe) festgestellt werden (p>0,05).

3.2. Läsionsgröße und deren Verteilung

Die ischämischen Läsionen waren auf den ADC-maps, die von den letzten diffusionsgewichteten Bildern (150 Minuten nach Makrosphäreninjektionen) errechnet wurden, deutlich sichtbar.

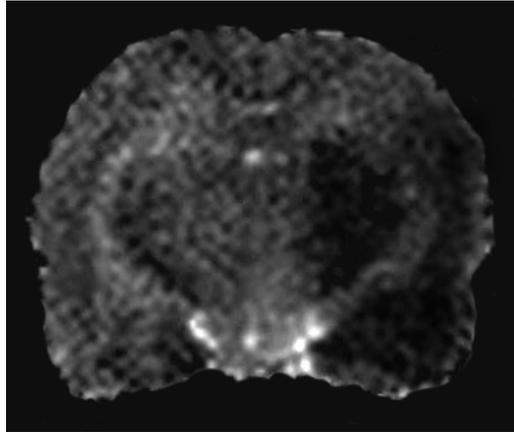


Abb.36: Diffusionsgewichtete MRT (ADC-map) 150 Minuten nach Ischämieinduktion. Rechts: Deutliche Demarkierung eines frischen Hirninfarkts im Versorgungsgebiet der A. cerebri media (dunkel dargestellt).

Zu diesem Zeitpunkt waren bei allen Tieren große Anteile des subkortikalen Versorgungsgebietes der A. cerebri media infarziert. Bei sechs von acht Tieren war anteilig auch das kortikale Versorgungsgebiet der A. cerebri media infarziert. Die Läsionsgrößen lagen zwischen 8,6% und 27,2% der Hemisphäre. Hierbei ergab sich ein Mittelwert von 18,0% und eine Standardabweichung von $\pm 7,4\%$. Ein Tier zeigte nach der Makrosphäreninjektion keine ischämische Läsion.

In der Kontrollgruppe zeigte sich bei allen Tieren ein unauffälliger zerebraler Befund.

3.3. Quantifizierung des zytotoxischen Hirnödems (ADC)

Unmittelbar nach Verschluss der A. cerebri media ließ sich ein signifikanter ADC-Abfall nachweisen ($p < 0,05$). In den folgenden 45 Minuten kam es zu einem weiteren Abfall. Im weiteren Verlauf stabilisierten sich die ADC-Werte auf niedrigem Niveau. Innerhalb der ischämischen Läsion konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen ADC-Werten, die im kortikalen und subkortikalen Anteil gemessen wurden, detektiert werden ($p > 0,05$).

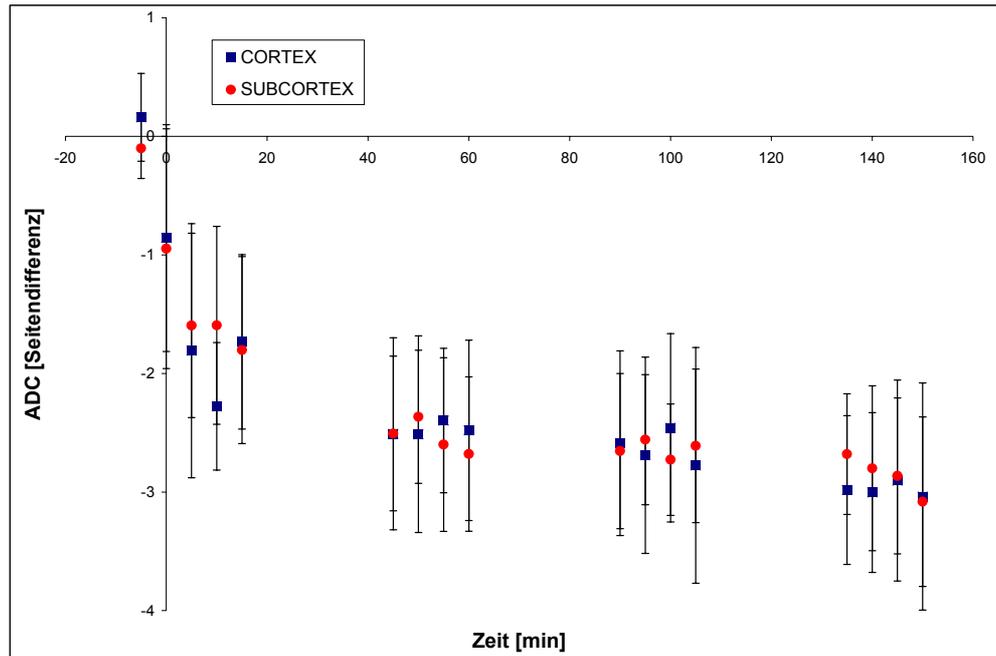


Abb.37: Diffusionsgewichtetes MRT: Zeitverlauf der ADC-Werte innerhalb des ischämischen Areals: bereits unmittelbar nach Ischämiebeginn (Zeitpunkt 0) kam es zu einem signifikanten ADC-Abfall ($p < 0.05$).

Bei den 5 Tieren der Kontrollgruppe war kein ADC-Abfall zu beobachten. Entsprechendes galt für das Tier ohne ischämische Läsion ($p > 0.05$).

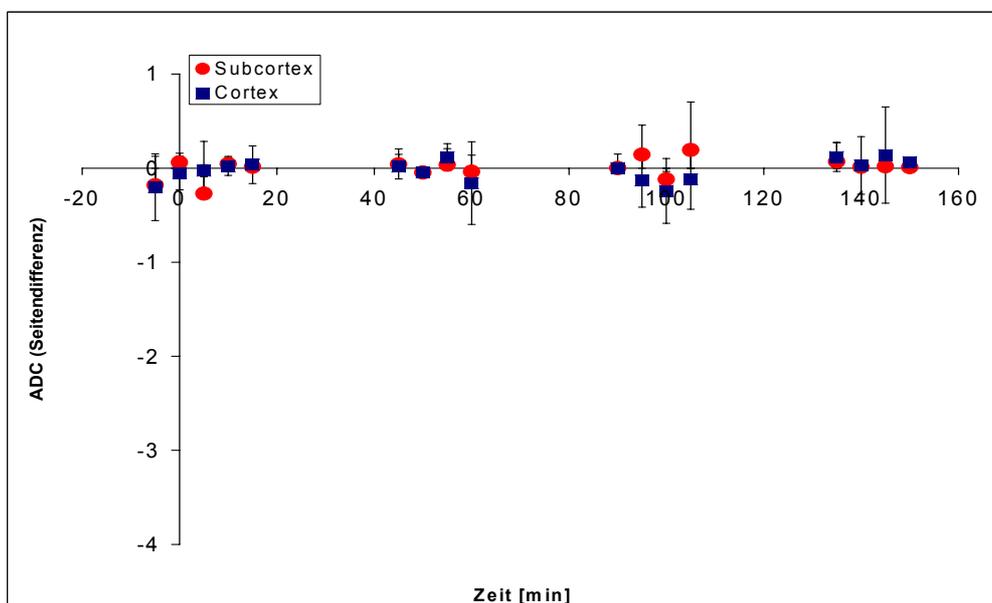


Abb.38: Diffusionsgewichtetes MRT: Zeitverlauf der ADC-Werte in der Kontrollgruppe: Bei diesen Tieren wurde kein ADC-Abfall festgestellt

3.4. Quantifizierung des vasogenen Hirnödems (T2-Relaxationszeit)

Die T2-Relaxationszeit wurde ebenfalls in den kortikalen und subkortikalen Arealen der ischämischen Läsion gemessen und stieg bereits bei der ersten Messung, die 20

Minuten nach Ischämieinduktion gestartet wurde, signifikant an ($p < 0.01$). Im weiteren Verlauf kam es zu einem kontinuierlichen linearen Anstieg der T2-Relaxationszeit. Es konnte hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den kortikalen und subkortikalen Anteilen der ischämischen Läsion beobachtet werden ($p > 0.05$).

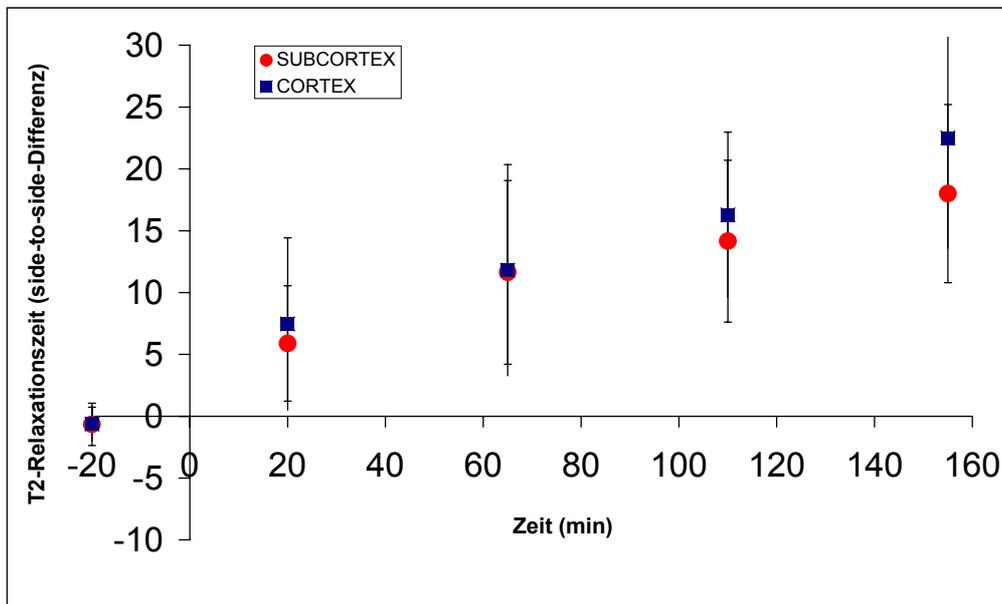


Abb.39: Zeitverlauf der T2-Relaxationszeit: Die T2-Relaxationszeit stieg nach Ischämieinduktion (Zeitpunkt 0) während der gesamten Versuchszeit kontinuierlich linear an.

Sowohl das Tier ohne Infarkt als auch die Tiere der Kontrollgruppe wiesen normale T2-Relaxationszeiten auf, die im zeitlichen Verlauf unverändert blieben ($p > 0,05$).

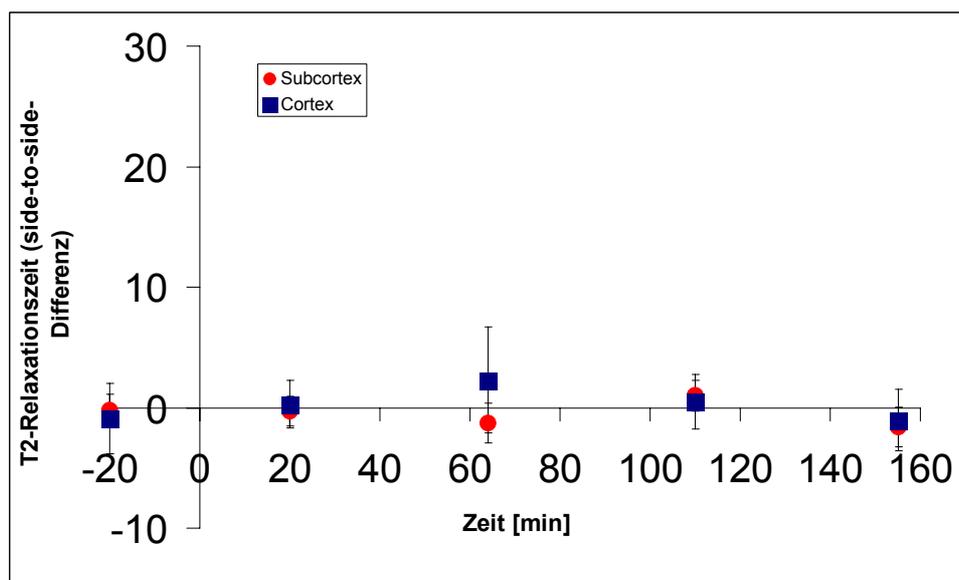


Abb.40: Zeitverlauf der T2-Relaxationszeit in der Kontrollgruppe: Keine Änderung im zeitlichen Verlauf.

3.5. Klinisch-neurologischer Befund

Fünf Stunden nach der Injektion der Makrosphären hatten sich die Tiere vollständig von der Narkose erholt. Acht von neun Tieren entwickelten eine hochgradige linksseitige Hemiparese mit einem klinisch-neurologischen Score zwischen 1 und 3 (Median: 3). Dabei lag ein Mittelwert von 2.3 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,5$ vor.

Das Tier ohne ischämische Läsion und die Kontrolltiere zeigten keine neurologischen Defizite.

3.6. Histopathologische Befunde

Während der Autopsie konnten intrakranielle Blutungskomplikationen ausgeschlossen werden. Die Inspektion der basalen Hirnarterien zeigte bei 8 von 9 Tieren einen direkten oder funktionellen Verschluss des A. cerebri media-Hauptstammes (direkte Verlagerung des M1-Segments oder aller Zuflüsse). Bei einem Tier zeigte sich eine anatomische Variante mit einem doppelt angelegten A. cerebri media-Hauptstamm. Bei diesem Tier blockierten die Makrosphären lediglich den proximalen, jedoch nicht den distalen Anteil des A. cerebri media-Hauptstammes. Die A. cerebri media konnte daher über die A. cerebri anterior der Gegenseite perfundiert werden. Dieses Tier zeigte keine neurologischen Ausfälle, keinen Hirninfarkt in der MR-Bildgebung, normale T2-Relaxationszeiten und ADC-Werte und wurde daher als „Modellversager“ von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen.⁵⁰

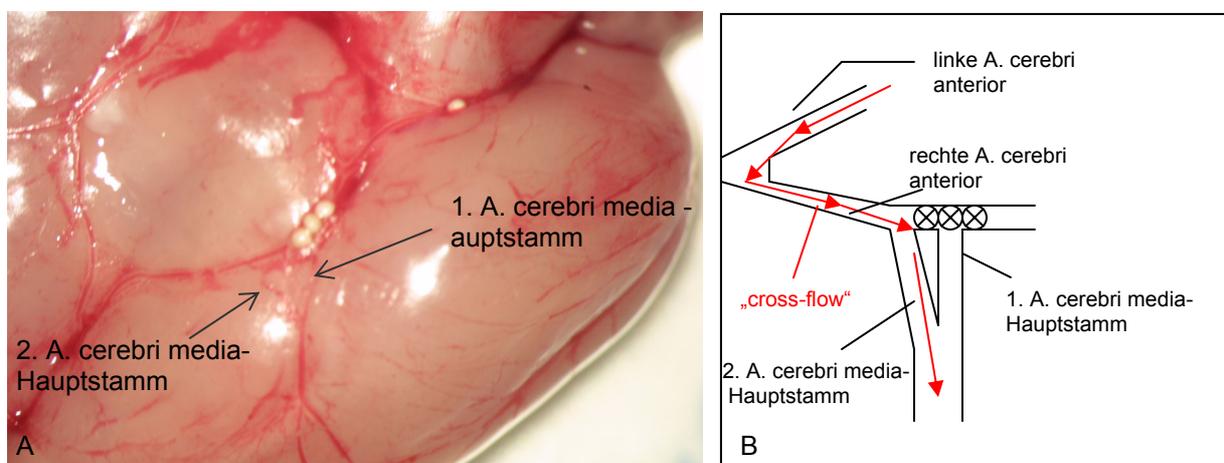


Abb.41: Doppelt angelegter A. cerebri media-Hauptstamm als Normvariante (A:Foto, B:Schemazeichnung). Die Makrosphären blockieren lediglich den proximalen Hauptstamm. Ein „Crossflow“ aus der contralateralen A. carotis über die A. communis anterior versorgt die A. cerebri media. Dieses Tier entwickelte keinen Hirninfarkt.

V. Diskussion

1. Einleitung

Die Behandlung des akuten Schlaganfalls stellt in der modernen Medizin ein noch immer weitgehend ungelöstes Problem dar. Wesentliche Ursache ist die im Vergleich mit anderen Organen erheblich höhere Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber Durchblutungsstörungen. So sind Nervenzellen bereits wenige Minuten nach Unterbrechung der Zufuhr von Sauerstoff und Glukose irreversibel geschädigt, während beispielsweise Herzmuskelzellen auch mehrere Stunden ohne Blutversorgung überleben können.⁹⁶ Daher kommt der Entwicklung von Therapiestrategien in der Akutphase des Hirninfarkts eine besondere Bedeutung zu. Tierexperimentelle Studien spielen hier eine Schlüsselrolle und fungieren als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Evaluation und Weiterentwicklung eines neuen tierexperimentellen Modells zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien. Dieses sogenannte Makrosphärenmodell soll die pathophysiologischen Vorgänge des Hirninfarkts am Menschen genauer als bisher simulieren und so die Übertragbarkeit tierexperimenteller Krankheitsmodelle auf den Menschen verbessern. Ferner soll es durch den Einsatz nicht-invasiver Bildgebungsverfahren (Magnetresonanztomographie) die Aussagekraft tierexperimenteller Untersuchungen erhöhen und den „Verbrauch“ an Versuchstieren vermindern.

Das Penumbra-Konzept

Anders als bei globalen Ischämien, bei denen die gesamte Blutversorgung des Gehirns unterbrochen ist (z.B. beim Herzstillstand) kommt es bei einem embolischen Verschluss einer einzelnen Hirnarterie (Schlaganfall) nur in einem Teilbereich des betroffenen Gewebes zu einem vollständigen Erliegen der Durchblutung. Die Nervenzellen in diesem Infarktkern sind nach wenigen Minuten unwiederbringlich geschädigt und damit einer Behandlung kaum zugänglich. Die Randbereiche des betroffenen Gewebes werden jedoch in unterschiedlichem Ausmaß durch benachbarte Hirnarterien durchblutet und unterliegen somit lediglich einer Unterversorgung. Die Nervenzellen dieser „ischämischen Penumbra“ metabolisieren noch in geringem Umfang Glukose. Die in diesem Areal *aktiv* ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge führen im Laufe einiger Stunden zu einem

sukzessiven Absterben der Nervenzellen – es kommt zu einer Ausbreitung der Infarktzone. Tierexperimentelle und einzelne klinische Studien deuten darauf hin, dass etwa 50 bis 70% des minderperfundierten Hirnvolumens in den ersten Minuten irreversibel geschädigt werden. Die verbleibenden etwa 30 bis 50% (die Penumbra) gehen in den folgenden 3 bis 6 Stunden zu Grunde und sind in diesem engen Zeitfenster therapeutischen Interventionen zugänglich.⁹⁶

Therapiemöglichkeiten

Grundsätzlich ergeben sich für die Behandlung des akuten Hirninfarkts zwei therapeutische Ansatzmöglichkeiten:

1. Reperfusion

Die Wiedereröffnung der verschlossenen Hirnarterie kann die vollständige Ausbreitung des Hirninfarkts stoppen. Allerdings wird der therapeutische Nutzen durch pathophysiologische Vorgänge limitiert, die durch die abrupte Reperfusion angestoßen werden. Diese werden unter dem Überbegriff „Reperfusionsschaden“ zusammengefasst.¹⁴⁰

Klinisch hat sich die systemische Applikation von rtPA in den ersten 3 Stunden nach Ischämiebeginn als wirksam erwiesen und ist seit August 2000 in Deutschland zugelassen. Wegen der zahlreichen möglichen Komplikationen (insbesondere Einblutungen in das Infarktareal) ist die Anwendung dieser Substanz zur Thrombolyse nur unter strenger Indikationsstellung und Beachtung zahlreicher Kontraindikationen möglich. Daher kommt dieses Therapieverfahren derzeit nur bei etwa 2 bis 5% aller Schlaganfallpatienten zur Anwendung.^{36,47,66,114,141} Weiterentwicklungen dieses therapeutischen Prinzips, wie die lokale Thrombolyse im Rahmen einer Angiographie oder Verstärkung des thrombolytischen Effekts durch therapeutischen Ultraschall befinden sich derzeit in der präklinischen und klinischen Erprobung.

2. Neuroprotektion

Verschiedene pharmakologische und physikalische Therapieverfahren ermöglichen eine Beeinflussung der sogenannten postischämischen Kaskade, die zu der Ausbreitung des Infarktkerns innerhalb der Penumbra führt. NMDA-Rezeptorantagonisten, die die durch die überschießende Freisetzung von Glutamat

induzierte Toxizität begrenzen, Substanzen, die freie Radikale binden und die moderate Hypothermie seien hier als Beispiele genannt.

In tierexperimentellen Studien sind inzwischen zahlreiche neuroprotektiv wirksame Substanzen identifiziert worden. In den letzten 2 Jahrzehnten wurden etwa 50 davon in über 115 kontrollierten klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit überprüft. Leider ließ sich in keiner Studie bisher eine signifikante Wirksamkeit am Patienten nachweisen.⁵⁸

Warum wirken neuroprotektive Pharmaka im Tiermodell und scheitern in klinischen Studien?

Zu den Ursachen des Scheiterns klinischer Neuroprotektionsstudien haben in den letzten Jahren zahlreiche interdisziplinäre Expertengruppen unterschiedliche Hypothesen generiert. Einige sind im Folgenden wiedergegeben:^{44,58,150,151}

- In tierexperimentellen Untersuchungen werden kürzere „therapeutische Zeitfenster“ verwendet als in klinischen Studien. So liegt der Therapiebeginn in präklinischen Studien typischerweise zwischen 0 und 90 Minuten nach Ischämiebeginn, während für klinische Studien häufig Zeitfenster von 3 bis 24 Stunden verwendet werden. Es ist zu vermuten, dass die Behandlung in zahlreichen klinischen Untersuchungen zu einem Zeitpunkt begonnen wurde, an dem keine Penumbra mehr vorliegt.
- In tierexperimentellen Studien werden Pharmaka in Dosierungen getestet, die für eine Anwendung am Menschen zu hoch sind.
- Neuroprotektiva werden tierexperimentell an Modellen mit territorialen Hirninfarkten evaluiert, während in zahlreichen klinischen Studien auch Patienten mit subkortikalen (z.B. lakunären) Infarkten eingeschlossen werden.
- In der Mehrzahl tierexperimenteller Studien ist die Beobachtungsdauer (typischerweise 24 Stunden bis eine Woche) erheblich kürzer als in klinischen Studien.
- In präklinischen Studien wird der neuroprotektive Effekt primär anhand der Reduktion der Läsionsgröße evaluiert während in klinischen Studien das klinisch-funktionelle Outcome als primärer Endpunkt verwendet wird.
- In tierexperimentellen Modellen wird praktisch ausschließlich ein Verschluss des Hauptstammes der A. cerebri media simuliert während in klinischen Studien Patienten mit sehr heterogenen Gefäßbefunden untersucht werden (Ischämien in

der anterioren oder vertebrobasilären Zirkulation, Hauptstammverschlüsse, Astverschlüsse, lakunäre Infarkte, Grenzzoneninfarkte, etc.).

- Tierexperimentelle Schlaganfallmodelle weisen „Nebenwirkungen“ auf, die bei Menschen nicht vorkommen.
- Zahlreiche klinische Studien verwenden zu kleine Stichprobengrößen.

Zusammenfassend werden in den einschlägigen Übersichtsarbeiten zwei wesentliche Punkte als Ursachen für das Scheitern klinischer Neuroprotektionsstudien genannt: 1. Die Auswahl der tierexperimentellen Modelle und das Design präklinischer Studien bilden die klinische Situation des Schlaganfallpatienten nicht ausreichend ab. Die verwendeten Tiermodelle sind nicht ausreichend auf den Menschen übertragbar. 2. Beim Design klinischer Studien werden die Erkenntnisse aus präklinischen Untersuchungen häufig nicht ausreichend berücksichtigt oder fehlinterpretiert.

2. Fadenmodell und Makrosphärenmodell

2.1. Das Fadenmodell

Das Faden-Okklusionsmodell an der Ratte stellt die am weitesten verbreitete Technik zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien dar und weist im Vergleich mit anderen Techniken zahlreiche Vorteile auf.^{85,142,153}

- Das Fadenmodell ist ein endovaskuläres Modell und erfordert daher keine Eröffnung der Schädelkalotte (wie z.B. für direkte Ligaturtechniken der A. cerebri media notwendig). Folgende Nebenwirkungen einer Trepanation werden daher vermieden:
 - Lokale Kühlung des Kortex unter dem Trepanationsdefekt (wirkt neuroprotektiv)
 - Minderung des Hirndrucks
 - Blutungen in den Subarachnoidalraum
- Das Fadenmodell erlaubt eine Reperfusion zu definierten Zeitpunkten durch Zurückziehen des Okkluders.
- Vorzeitige Reperfusionen (z.B. durch vorzeitige spontane Lyse artifizieller Thromben in sogenannten Thrombembolienmodellen) kommen nicht vor.

Das Faden-Okklusionsmodell weist jedoch auch einige gravierende Nachteile auf:

1. Laser-Doppler-Messungen haben gezeigt, dass trotz vermeintlich korrekter Platzierung des Okkluders vorzeitige Reperfusionen vorkommen können, z.B. durch Dislokation des Fadens oder durch einen Restblutfluss entlang des Monofilaments bei weitgestellten Gefäßen.^{81,89,115,142}
2. Die Platzierung des Fadens in den basalen Hirnarterien erfordert großes manuelles Geschick und ist nur unter dem Operationsmikroskop sicher durchzuführen. Daher ist die Anwendung des Modells unter erschwerten Versuchsbedingungen (z.B. innerhalb des Magnetresonanztomographen oder an wachen Versuchstieren) kaum möglich.^{67,84,92,134,135}
3. Im Gegensatz zum Menschen weist die A. carotis externa der Ratte mehrere Äste auf, die durch den Faden mit verschlossen werden. Dies führt u.a. zu einem Verschluss der A. hypothalamica mit folgender Infarzierungen des Hypothalamus. Der Hypothalamus spielt bei Säugetieren und Menschen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Temperaturhaushalts. Die Schädigung dieses Organs durch das Fadenokklusionsmodell führt daher zu einem spontanen Anstieg der Körpertemperatur (bis 40°C). Dieses beim Menschen nicht zu beobachtende Phänomen führt zu einer Verstärkung der ischämischen Schädigung des Gehirns und kann die Ergebnisse von Neuroprotektionsstudien empfindlich verzerren. Allerdings tritt eine Hypothalamusschädigung nur bei Ischämiedauern über 120 Minuten auf.^{94,106,142,171}

2.2. Das Makrosphärenmodell

Wegen der gravierenden Auswirkungen der durch Hypothalamusinfarkte hervorgerufenen Hyperthermie auf Neuroprotektionsstudien sollte ein Tiermodell entwickelt werden, welches ähnlich dem Fadenmodell zu einem Verschluss der A. cerebri media führt, jedoch eine Okklusion der Äste der A. carotis interna, insbesondere der A. hypothalamica vermeidet. Dieses Problem sollte durch die intraarterielle Embolisation von Keramikugeln gelöst werden.

In diesem 2003 erstmals beschriebenen Modell wird nach Darstellung der A. carotis ein PE-50-Katheter über die A. carotis externa in die Carotidbifurkation vorgeschoben und so fixiert, dass der physiologische Blutfluss aus der A. carotis communis in die carotis interna nicht behindert wird. Über diesen Katheter werden dann 4 bis 6 Titanoxid-Kugeln mit einem Durchmesser zwischen 0.315 und 0.355mm eingespült, bis diese vom Blutstrom erfasst und in die basalen Hirnarterien getragen werden.

Dies soll zu einem direkten MCA-Hauptstammverschluss führen und gleichzeitig einen Verschluss der A. hypothalamica vermeiden.⁵⁰

3. Lassen sich mit dem Makrosphärenmodell typische Komplikationen des Fadenmodells vermeiden?

Wie eingangs ausgeführt stellt das 1986 von Koizumi⁸⁵ eingeführte Fadenmodell die am weitesten verbreitete Technik zur tierexperimentellen Induktion von Hirninfarkten dar. Dieses Modell ist außerordentlich reproduzierbar bei gleichzeitig geringer Invasivität und entsprechend geringen Mortalitäts- und Komplikationsraten. Allerdings ist auch dieses Modell nicht frei von Nebenwirkungen, die die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen beeinträchtigen können: So liegt ein wesentlicher Nachteil dieser Technik in der Verlegung der A. hypothalamica, die aus der distalen A. carotis interna entspringt. Die resultierende Infarzierung des Hypothalamus führt innerhalb weniger Minuten zu einer schwerwiegenden Störung der Temperaturregulation, die mit einem Anstieg der Körpertemperatur bis über 40°C verbunden ist. Diese pathologische Hyperthermie, die bei Menschen nicht zu beobachten ist, führt zu einer Aggravation der ischämischen Läsionen und kann nachweislich die Wirksamkeit neuroprotektiver Substanzen beeinträchtigen.^{94,106,171} Diese Nebenwirkung kann ausbleiben, wenn das Fadenokklusionsmodell zur Induktion transientscher Ischämien eingesetzt wird. Dabei wird der Faden zu einem definierten Zeitpunkt zurückgezogen und so eine Reperfusion ermöglicht. Liegt dieser Zeitpunkt unter 90 Minuten nach der Infarktinduktion kommt es zu einer vollständigen Erholung des Hypothalamus. Eine Hyperthermie tritt nicht auf.

Eine weitere Komplikation, die bei der Verwendung dieses Modells vorkommen kann, liegt in dem unvollständigen Verschluss der A. cerebri media (durch eine unzureichende Einführungstiefe des Fadens).^{81,89,115} Deshalb wird von einigen Arbeitsgruppen empfohlen, die korrekte Lage des Fadens mit Hilfe der Laser-Doppler-Technik zu überprüfen. Dabei kann der Abfall des LCBF (lokaler zerebraler Blutfluss) als Indikator für eine suffiziente Okklusion des Gefäßes herangezogen werden. Allerdings erfordert diese Technik eine Kraniotomie mit den entsprechenden Nebenwirkungen.^{84,142} Eine weitere Komplikation des Fadenmodells liegt in der Induktion subarachnoidaler Blutungen (durch Gefäßperforationen)^{87,89,98} und in der mechanischen Schädigung des Endothels, die theoretisch zur Bildung intraluminaler

Thromben führen kann.^{85,105,129} Ferner kann es durch eine Dislokation des Fadens zu unerwünschten, vorzeitigen Reperfusionen kommen, was bei bis zu 25% der Experimente auftreten soll.¹⁴²

In Experiment I und II der vorliegenden Arbeit wurde das neu entwickelte Makrosphärenmodell einem direkten Vergleich mit der etablierten Fadenokklusionstechnik unterzogen.

Im Experiment I wurde der neuroprotektive Effekt von Dizocilpin an drei verschiedenen Modellen einer permanenten Okklusion der A. cerebri media getestet. In der Gruppe II, in der das Makrosphärenmodell verwendet wurde, zeigte sich kein Schaden des Hypothalamus. Im Gegensatz dazu konnten in den Gruppen I, Fadenmodell, und Gruppe III, modifiziertes Makrosphärenmodell, durchgehend Schäden des Hypothalamus nachgewiesen werden. Die Infarzierung des Hypothalamus entsteht durch den Verschluss der A. hypothalamica, die ihren Ursprung im distalen Anteil der A. carotis interna hat.⁵⁰ Dieser Anteil des Gefäßes wird mit dem Faden (Gruppe I) oder mit den Makrosphären (Gruppe III) okkludiert. Dies ist aber in der Gruppe II nicht der Fall, da in diesem Modell nur eine limitierte Anzahl der Makrosphären embolisiert wurde und diese nicht den Blutfluss zur A. hypothalamica blockierten.^{68,94} Das modifizierte Makrosphärenmodell, das bei der Gruppe III zur Infarktinduktion verwendet wurde, diente als „Gegenprobe“, um zu belegen, dass die Hyperthermie nicht durch die geringfügig modifizierte Operationstechnik oder Materialeinbringung hervorgerufen wird, sondern ausschließlich durch den Verschluss der A. hypothalamica. Hier führte die hohe Zahl embolisierter Makrosphären zu einem langstreckigen Verschluss der A. carotis interna einschließlich des Abgangs der A. hypothalamica. Es resultierten – ebenso wie im Fadenmodell – ischämische Schädigungen des Hypothalamus mit pathologischer Hyperthermie. Dizocilpin entfaltete in diesem modifizierten Modell keine signifikante neuroprotektive Wirkung.

Im Experiment II wurden drei verschiedene endovaskuläre Techniken zur Okklusion der A. cerebri media verglichen. Die Induktion der fokalen zerebralen Ischämie wies bei allen Modellen eine gute Reproduzierbarkeit auf. In jedem Modell zeigten sich typische Komplikationen und Nebenwirkungen, die zu beachten sind, um eine Fehlinterpretation von experimentellen Ergebnissen zu vermeiden.

Ein Schaden des Hypothalamus wurde konstant im permanenten Okklusionsmodell der A. cerebri media mit der Fadentechnik (Gruppe II) beobachtet. Bei den Tieren, die der Reperfusiongruppe (Gruppe I) und der Makrosphärengruppe (Gruppe III) angehörten, wurde dieser Effekt vermieden. Nur ein Tier der Gruppe III entwickelte einen Hypothalamusinfarkt und wurde deshalb ausgeschlossen.

Zusammenfassend zeigte sich in den Experimenten I und II unter Verwendung des Makrosphärenmodell bei 6% (2/32) der Tiere ein Hypothalamusinfarkt, während bei Verwendung des Fadenmodells dieser Anteil 94% (30/32) betrug.

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass der Hypothalamusinfarkt durch die Verwendung des Makrosphärenmodells verhindert wird. Allerdings gibt es auch Ausnahmen (6%), die jedoch leicht durch eine postmortale Inspektion der zerebralen Gefäße zu erkennen sind und einen Ausschluss der betroffenen Tiere ermöglichen.

Im Experiment II wurden weitere mögliche Komplikationen des Fadenmodells mit untersucht.

Dabei spielte die Überprüfung der Okklusion der A. cerebri media eine wesentliche Rolle, da alle endovaskulären Modelle bei der Okklusion der A. cerebri media scheitern können.^{53,142} Diese Tiere müssen identifiziert und ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Studie wurde eine Kombination aus einer frühen klinischen Untersuchung und einer time-of-flight MR-Angiographie angewendet, um die korrekte Okklusion der A. cerebri media zu überprüfen.

Die neurologische Untersuchung wurde drei Stunden nach Infarktinduktion nach der von Zea Longa et al beschriebenen Skala durchgeführt.⁹⁸ Viele Autoren empfehlen, dass Tiere, die keine klinischen Anzeichen einer fokalen, zerebralen Ischämie zeigen, von derartigen Studien ausgeschlossen werden, da dies auf einen erfolglosen Okklusionsversuch hinweist. In der vorliegenden Studie zeigten zwei Tiere (ein Tier aus der Gruppe II und ein Tier aus Gruppe III) keine klinischen Defizite nach der Okklusion der A. cerebri media und wurden deshalb ausgeschlossen. Das Fehlen der A. cerebri media-Okklusion wurde durch die TTC-Färbung nach 24 Stunden an beiden Ratten zusätzlich nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu zeigten bei Verwendung der Fadentechnik einige Tiere fokalneurologische Defizite obwohl der Verschluss der A. cerebri media fehlschlug. Zwei Ratten der Gruppe II zeigten fokale neurologische Defizite 3 Stunden nach

Einbringung des Fadens. MR-angiographisch war jedoch kein Gefäßverschluss zu erkennen. Bei einer genauen Betrachtung der T2-gewichteten Bildgebungen und der TTC-gefärbten Gehirne zeigten sich kleine Läsionen, die im Stromgebiet der A. choroidea anterior, nicht jedoch im Versorgungsgebiet der A. cerebri media lokalisiert waren. Es lässt sich schlussfolgern, dass bei diesen speziellen Tieren der Okkluder nicht tief genug in die A. carotis interna eingeführt wurde, so dass die Spitze des Fadens die A. choroidea anterior, die ihren Ursprung im intrakraniellen Anteil der A. carotis interna hat, und nicht die A. cerebri media okkludierte.^{68,94}

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen jeglicher klinischer neurologischer Defizite darauf hindeutet, dass das Model bei der Okklusion der A. cerebri media fehlgeschlagen ist. Das Vorhandensein neurologischer Defizite ist dagegen alleine kein Beweis für eine erfolgreiche Okklusion der A. cerebri media, sondern muss durch zusätzliche Methoden, wie die MR-Angiographie nachgewiesen werden.

Die time-of-flight Angiographie ermöglicht die nicht-invasive Darstellung des intrakraniellen Gefäßstatus bei Nagetieren ohne Verwendung von Kontrastmitteln und das Verfahren kann beliebig häufig wiederholt werden, wobei es die Dokumentation der erfolgreichen A. cerebri media-Okklusion und Reperfusion ermöglicht.^{16,130}

Eine weitere typische Komplikation des Fadenmodells ist die subarachnoidale Hämorrhagie, die durch eine Perforation des intrakraniellen Anteils der A. carotis interna oder der A. cerebri anterior hervorgerufen wird.^{50,53,142,165} Diese Komplikation wurde durch die postmortale Untersuchung bei einem von 11 Tieren in Gruppe I (9%) und bei zwei von 15 Tieren in der Gruppe II (13%) nachgewiesen. Subarachnoidalblutungen können zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Vasospasmen und intrazerebralen Hämatomen führen, die die Ergebnisse experimenteller Schlaganfallstudien beeinflussen. Frühere Studien zeigten, dass die Verwendung eines Laser-Dopplers das Auftreten von subarachnoidalen Hämorrhagien reduzieren kann.^{142,165} In der vorliegenden Studie wurde kein einziger Fall einer subarachnoidalen Hämorrhagie bei den Tieren dokumentiert, die der Makrosphärengruppe (Gruppe III) angehörten. Daher scheinen Subarachnoidalblutungen eine seltene bis nicht auftretende Komplikation dieses Modells zu sein.

4. Zusammenhang zwischen Hypothalamusinfarkten und Hyperthermie

Dass Hypothalamusinfarkte zu einem pathologischen Anstieg der Körperkerntemperatur führen, wurde schon von einigen anderen Arbeitsgruppen beobachtet. Diese Hyperthermie ist durch eine ischämische Läsion des Hypothalamus erklärbar - dem wichtigsten Thermoregulationszentrum bei Säugetieren.^{50,94,108,138} Der pathologische Temperaturanstieg nach der permanenten Okklusion mit dem Fadenmodell wird durch die Obstruktion der A. hypothalamica, welche ihren Ursprung am distalen Anteil der A. carotis interna hat, hervorgerufen, da der Faden die gesamte A. carotis interna von der Bifurkation bis zum Ursprung der A. cerebri media okkludiert. Li et al. zeigten, dass bei Anwendung des Fadenmodells zum transienten Verschluss der A. cerebri media eine spontane Hyperthermie induziert wird, die mit einem Schaden des Hypothalamus assoziiert ist, wenn die Reperfusion später als zwei Stunden nach Ischämieinduktion eingeleitet wird.⁹⁴

In der Studie von Zhen et al. wurde durch die Einbringung des Fadens bis kurz vor den Ursprung der A. cerebri media selektiv nur die A. hypothalamica und/oder die A. choroidea verschlossen. Diese Tiere erlitten Hypothalamusinfarkte und wiesen einen pathologischen Anstieg der Körperkerntemperatur auf. Damit konnten die Autoren belegen, dass Hypothalamusinfarkte für die resultierende Hyperthermie verantwortlich sind.⁶⁸

Zhao et al. demonstrierten, dass der intraluminal eingebrachte Faden die Blutversorgung des Hypothalamus stört und zu der beobachteten Hyperthermie führt. In dieser Untersuchung wurden Ratten einer permanenten, 1-stündigen oder 2-stündigen Ischämie unterzogen. Vor der Reperfusion wurden die Tiere aller Gruppen durch externe Kühlung normotherm gehalten. Im Anschluss an die ein- bis zweistündige Kühlung zeigten die Tiere der Reperfusionsgruppen keinen Temperaturanstieg, der jedoch bei den Tieren mit permanenter Ischämie zu beobachten war.¹⁷¹

In Experiment I konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Fadenmodells zum permanenten MCA-Verschluss zu Hypothalamusinfarkten und zu einer pathologischen Hyperthermie führt (Gruppe I). Durch den Einsatz der Makrosphärentechnik (Gruppe II) konnten beide Nebenwirkungen vermieden werden. Um sicherzustellen, dass das Ausbleiben der pathologischen Hyperthermie in

Gruppe II tatsächlich auf der Vermeidung von Hypothalamusschädigungen und nicht etwa auf der geringfügig anderen Operationstechnik oder der Verwendung anderer Fremdmaterialien beruht, wurde ein drittes Experiment als „Gegenprobe“ durchgeführt. Hierzu wurde das Makrosphärenmodell modifiziert: Statt 4 bis 6 Makrosphären wurden 10 Keramikugeln injiziert. Dadurch wurde ein langstreckiger Verschluss der distalen A. carotis interna gewährleistet, was -ähnlich wie bei dem Fadenmodell- zu einem Verschluss der A. hypothalamica führt. Diese Tiere entwickelten Hypothalamusinfarkte und zeigten eine pathologische Hyperthermie.

Eine statistische Betrachtung aller Tiere dieses Experiments (Gruppe I bis III) zeigte eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur und dem Vorhandensein von Hypothalamusinfarkten.

Die vorliegende Arbeit konnte somit die bereits von Li et al. und anderen aufgestellte Hypothese zum Zusammenhang zwischen Hypothalamusinfarkten und Hyperthermie erhärten, indem erstmalig ein Modell zur Gegenprobe herangezogen wurde, welches ausgedehnte Hirninfarkte ohne Beteiligung des Hypothalamus zu induzieren vermag.

Im Gegensatz zu permanenten Gefäßverschlüssen kommt es in sogenannten Ischämie-Reperfusionenmodellen, bei denen innerhalb von 120 Minuten eine Reperfusion der A. cerebri media eingeleitet wird, nicht zu Hypothalamusinfarkten. Auch eine pathologische Hyperthermie bleibt in diesen Modellen aus.^{90,142} Li et al konnten anhand von magnetresonanztomographischen Verlaufsuntersuchungen zeigen, dass der Abfall des zerebralen Blutflusses und der ADC-Werte innerhalb des Hypothalamus sich komplett zurückbilden, wenn der Faden innerhalb von 90 Minuten nach Ischämieinduktion entfernt wird. Nachdem die Tiere sich von der Anästhesie erholt hatten, waren sie normotherm und zeigten bei der TTC-Färbung nach 24 Stunden keinen Hypothalamusinfarkt.⁹⁴ Die Normalisierung der initial pathologisch verminderten ADC-Werte ist bemerkenswert und belegt, dass Läsionen in der diffusionsgewichteten Bildgebung nicht notwendigerweise eine Infarzierung des betroffenen Gewebes anzeigen müssen. Diese Erholung des Hypothalamus unter Ischämie-Reperusionsbedingungen kann durch die multiple Blutversorgung dieses Organs erklärt werden, welche hauptsächlich durch die A. hypothalamica, aber auch durch Äste der A. cerebri anterior und A. communicans posterior gewährleistet wird. Diese zusätzlich versorgenden Äste wurden durch den Faden nicht okkludiert und scheinen den Blutfluss über die contralaterale Hemisphäre aufrecht zu erhalten.

Diese anatomischen Gegebenheiten erklären die bemerkenswerte Ischämieresistenz des Hypothalamus und das Fehlen der Hyperthermie bei der Verwendung des Fadenmodells unter Ischämie-Reperusionsbedingungen.⁹⁴

5. Beeinflusst die pathologische Hyperthermie tierexperimentelle Neuroprotektionsstudien?

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Neuroprotektionsstudie (Experiment I) durchgeführt. Im Vergleich mit Placebo zeigte eine Dizocilpin-Gabe keine signifikante Reduktion der Läsionsvolumina, wenn das eingesetzte Okklusionsmodell zu Hypothalamusinfarkten und einer pathologischen Hyperthermie führte. Bei Verwendung des neu entwickelten Makrosphärenmodells zeigte sich dagegen ein robuster neuroprotektiver Effekt mit einer Reduktion der mittleren Läsionsvolumina um 60%.

Diese Ergebnisse belegen, dass das Auftreten von Hypothalamusinfarkten und einer pathologischen Hyperthermie die Wirkung neuroprotektiver Substanzen verändern und somit zu falsch-negativen Ergebnissen führen können.

Zahlreiche pathophysiologische Vorgänge während fokaler und auch globaler zerebraler Ischämien zeigen eine Abhängigkeit von der Körpertemperatur. Dazu zählt u.a. die Neurotransmitterfreisetzung, welche durch die Hyperthermie akzentuiert und durch eine Hypothermie vermindert werden kann.⁵⁷ Auch die Produktion von Sauerstoffradikalen zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit und kann bei erhöhter Körperkerntemperatur um das fünffache gesteigert sein.⁵⁷

Dass bei der Verwendung des Fadenmodells pathologische Temperaturanstiege auftreten, die zur Maskierung neuroprotektiver Effekte führen können, wurde erstmals von Memezawa et al. beschrieben. In diesem Experiment wurde der neuroprotektive Effekt von Dizocilpin unter Verwendung des transienten Fadenmodells untersucht, wobei eine Gruppe während der ersten 6 Stunden nach Ischämieinduktion gekühlt wurde, so dass die Körpertemperatur zwischen 37 und 38°C lag. Eine zweite Versuchsgruppe diente als Kontrolle. Hier wurde kein Einfluss auf den Verlauf der Körperkerntemperatur genommen. Die Ergebnisse zeigten, dass Dizocilpin bei den nicht gekühlten Tieren keinen neuroprotektiven Effekt entfaltete. Im Gegensatz dazu zeigten die temperaturkontrollierten Tiere, die mit Dizocilpin

behandelt wurden, signifikant geringere Infarktgrößen ($p < 0,025$).¹⁰⁶ Diese Ergebnisse und die vorliegende Studie zeigen, dass die pathologische Hyperthermie den neuroprotektiven Effekt von Dizocilpin verschleiert. Die von Memezawa et al.¹⁰⁶ vorgeschlagene externe Kühlung der Tiere scheint für Neuroprotektionsstudien jedoch unpraktikabel – zumal eine Temperaturregulation während der gesamten Versuchsdauer (und nicht nur während der ersten 6 Stunden) wünschenswert wäre. Ferner kann eine externe Kühlung Sekundärkomplikationen wie Pneumonien hervorrufen.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit zeigte eine Studie von Minematsu et al., dass der Einsatz von Dizocilpin bei der Verwendung des permanenten Fadenmodells zu einem deutlichen neuroprotektiven Effekt mit einer Reduktion der Infarktgröße um 48% führt.⁷⁹ Es ist anzunehmen, dass auch in dieser Studie Hypothalamusinfarkte und pathologische Temperaturanstiege vorgekommen sind, obwohl darauf nicht explizit eingegangen wurde. Weshalb die pathologische Hyperthermie in dieser Studie zu keiner Maskierung des neuroprotektiven Effekts von Dizocilpin führte, ist unklar. Denkbar ist jedoch ein Einfluss des verwendeten Narkoseregimes. In der Studie von Minematsu wurden die Tiere während des operativen Eingriffs und für die folgenden 90 Minuten mit Chloralhydrat anästhesiert. Diese Narkoseform führt besonders bei kleinen Tieren zu einem raschen Auskühlen und erfordert daher eine kontrollierte, externe Wärmezufuhr, mit der die Körperkerntemperatur konstant bei 37°C gehalten wird. Ferner benötigen Ratten nach einer Chloralhydratnarkose ca. 30 bis 60 Minuten, um sich von dieser Anästhesie zu erholen. Auch in dieser Zeit ist eine externe Wärmezufuhr notwendig. Es ist daher anzunehmen, dass die Tiere in dieser Studie für mehr als 2 Stunden nach Ischämieinduktion normotherm gehalten wurden und eine durch Hypothalamusschädigungen bedingte artifizielle Hyperthermie insbesondere in der besonders vulnerablen hyperakuten Phase der Ischämie nicht auftreten konnte.

In der vorliegenden Studie wurde dieser Effekt der Anästhesie durch den Gebrauch von Isofluran minimiert. Durch die Anwendung dieses Verfahrens erwachten die Tiere sehr früh nach Ischämieinduktion (nach ca. 5 Minuten), so dass die Körperkerntemperatur nicht weiter beeinträchtigt wurde. Die schnelle Elimination von Isofluran direkt nach Ischämieinduktion minimiert ferner potenzielle neuroprotektive Effekte der anästhetischen Substanz, welche auch Ergebnisse von Schlaganfallstudien beeinflussen können.

Ein Anstieg der Körpertemperatur wird auch häufig bei Schlaganfallpatienten beobachtet und verschlechtert die Prognose.⁶⁴ Bei diesem Temperaturanstieg handelt es sich jedoch wahrscheinlich eher um Fieber als um eine Hyperthermie, da er in der Regel erst als Sekundärkomplikation (ausgelöst z.B. durch Pneumonien oder Harnwegsinfekte) auftritt. Der Anstieg der Körperkerntemperatur erfolgt bei Patienten daher erst mit deutlicher zeitlicher Latenz zu Beginn der zerebralen Ischämie und nicht in der (besonders vulnerablen) Frühphase des Schlaganfalls.

6. Verbessert die Verwendung des Makrosphärenmodells die Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Erkenntnisse auf den Menschen?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei Verwendung des neu entwickelten Makrosphärenmodells gravierende Nebenwirkungen des etablierten Fadenmodells nicht auftreten. So lassen sich mit dieser Technik Hypothalamusinfarkte, die beim Menschen nicht vorkommen, und die hieraus resultierende pathologische Hyperthermie vermeiden. Die Ergebnisse der Neuroprotektionsstudie (Experiment I) belegen, dass die Beispielsubstanz Dizocilpin im permanenten Faden-Okklusionsmodell keinen signifikanten neuroprotektiven Effekt entfalten kann, während sich im Makrosphärenmodell eine hochsignifikante Reduktion der Infarktgrößen nachweisen lässt. Durch eine Modifikation des Makrosphärenmodells (Injektion von 10 anstatt 4 Sphären) konnten auch mit diesem Modell die Nebenwirkungen der Faden-Technik simuliert werden, was wiederum zu einem Versagen des neuroprotektiven NMDA-Antagonisten führte. Diese Studie belegt, dass das Auftreten der durch Hypothalamusinfarkte induzierten pathologischen Hyperthermie zu einer Maskierung des neuroprotektiven Effekts dieser Substanz führte und stützt damit die bereits 1995 von Memezawa et al.¹⁰⁶ formulierte Hypothese. Der Einsatz des Makrosphärenmodells kann daher die Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Ergebnisse auf den Menschen verbessern.

Bisher ist unklar, ob das Auftreten einer pathologischen Hyperthermie nur die Effektivität von NMDA-Antagonisten mindert, oder ob dies auch für andere neuroprotektiven Substanzklassen gilt. Diesbezüglich sind weitere Studien notwendig. Dennoch kann bereits jetzt die Vermutung geäußert werden, dass durch

die Nebenwirkungen des Fadenokklusionsmodells eine Reihe aussichtsreicher Substanzen falsch-negativ getestet und daher nicht weiter verfolgt wurden.

Einschränkend muss jedoch auch erwähnt werden, dass die mangelnde Übertragbarkeit der mit der Faden-Technik gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen nur für permanente MCA-Verschlussmodelle gilt.

Klinische Studien zeigen, dass der Gefäßbefund bei Schlaganfallpatienten sehr heterogen ist. Häufig finden sich passagere Gefäßverschlüsse, die durch spontane Thrombolyse nach unterschiedlich langer Zeit rekanalisieren, aber auch permanente Gefäßverschlüsse sowie Mischbilder (Fragmentierung größerer Thromben in proximalen Hirnarterien mit Embolisation in distale, kleinere Gefäße). Diese heterogenen Gefäßbefunde lassen sich im Tiermodell kaum adäquat abbilden. Als Kompromiss wurde von einer Expertenkommission („Stroke Therapy Academic Industry Round Table“) gefordert, dass neuroprotektive Substanzen in permanenten und auch in transienten MCA-Verschlussmodellen getestet werden sollten, um der unterschiedlichen Pathophysiologie zwischen permanenter Ischämie und der Ischämie-Reperfusionssituation Rechnung zu tragen.⁴⁴ Die Wirksamkeit potenzieller neuroprotektiver Substanzen sollte unter beiden Bedingungen belegt sein, bevor eine weitergehende klinische Testung erfolgt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich durch den Einsatz des Makrosphärenmodells zur Simulation von permanenten Gefäßverschlüssen die Übertragbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen weiter verbessern lässt. Zur Simulation von Ischämie-Reperfusionssbedingungen kann weiterhin das Fadenmodell verwendet werden, sofern die Ischämiedauer 90 Minuten nicht übersteigt, da unter diesen Bedingungen keine Hypothalamusinfarkte und pathologische Hyperthermien auftreten.

7. Weitere Anwendungen für das Makrosphärenmodell: In-bore-Okklusion

Untersuchungen des ischämischen Schadens innerhalb der hyperakuten Phase des Schlaganfalls waren bis dato nur schwer möglich, da der experimentelle Schlaganfall gewöhnlich außerhalb des Kernspintomographen induziert wird. Die Zeit, die benötigt wird, um die Tiere innerhalb des Kernspintomographen zu platzieren und den MRT-Scanner zu adjustieren (typischerweise zwischen 20 bis 40 Minuten), führt dazu,

dass in dieser Zeit noch keine Messungen stattfinden können. Die hyperakute Phase der fokalen zerebralen Ischämie stellt somit eine Lücke in der Datenerhebung dar. Ferner war ein direkter „pixel-by-pixel“-Vergleich der prä- und postischämischen Bilder nicht möglich, da die Tiere nach der Baseline-Bildgebung zur Ischämieinduktion wieder aus dem Kernspintomographen entfernt werden mussten. Diese Probleme können nur durch eine Schlaganfallinduktion innerhalb des Kernspintomographen (sog. „in-bore“ Okklusion) umgangen werden. Nur mit dieser Technik ist es möglich, MRT-Studien in der hyperakuten Phase des experimentellen Schlaganfalls durchzuführen.^{84,92,135}

Bisher wurden weltweit lediglich 5 in-bore Experimente publiziert, die alle auf Modifikationen des bekannten Fadenokklusionsmodells beruhen.^{67,84,92,134,135} Bei dieser Technik wurde die Okklusion der A. cerebri media durch eine retrograde Insertion eines Monofilaments in die A. carotis interna vorgenommen. Der Faden wurde dabei so weit vorgeschoben, bis sich die Spitze in der A. cerebri anterior befand und somit den Blutfluss zur A. cerebri media blockierte. Da die Distanz zwischen der Karotisbifurkation und dem Ursprung der A. cerebri media von Tier zu Tier variiert, ist die optimale Einführtiefe des Okkluders schwer zu definieren. Perforationen der basalen zerebralen Arterien traten bei dieser Technik häufig auf. Ebenso häufig blieb ein Verschluss der A. cerebri media aus, wenn der Okkluder nicht ausreichend tief eingeführt wurde. In Studien, bei denen eine definierte Eindringtiefe verwendet wurde, lag die Fehlerrate des Modells zwischen 26 und 30%.^{84,134} Kohno et al demonstrierten, dass ein simultanes EEG-Monitoring das Risiko von Gefäßperforationen von 30% auf 5% verringern kann.⁸⁴ Allerdings ist die Manipulation von EEG-Elektroden innerhalb des Magnetfeldes eines Kernspintomographen nicht unproblematisch. Eine akzeptable Erfolgsrate von 88% wurde von Li et al. berichtet.⁹² In dieser Studie wurde der Faden – ähnlich wie bei der Anwendung außerhalb des Magneten- so tief eingeführt, bis ein leichter elastischer Widerstand zu spüren war, der das Eindringen des Okkluder in die A. cerebri anterior anzeigte. Mit dieser Technik wurde eine erfolgreiche Okklusion der A. cerebri media bei 76% der Tiere bei dem ersten Versuch beschrieben. Bei den übrigen Tieren wurden maximal 3 weitere Versuche durchgeführt, um den Okkluder in die richtige Position zu bringen. Obwohl die Erfolgsrate insgesamt bei 88% lag und somit vergleichbar ist mit der Erfolgsrate der A. cerebri media-Okklusion außerhalb des Kernspintomographen (92%), hat diese Technik ihre Limitationen: Erstens ist diese

Prozedur sehr zeitaufwendig und der exakte Zeitpunkt der Okklusion der A. cerebri media ist schwer zu bestimmen. Dies limitiert die Praktikabilität dieser Methode, um einen präzisen Zeitverlauf der Ischämie innerhalb der ersten Minuten nach Ischämieinduktion zu studieren. Zweitens erfordert die Handhabung dieser Technik viel Erfahrung, da der Widerstand durch die elastischen Eigenschaften der A. cerebri anterior sehr schwer zu spüren ist.⁹²

Mit Experiment III wurde ein neues In-bore-Okklusionsmodell der A. cerebri media entwickelt, welches die Induktion von Hirninfarkten innerhalb des Kernspintomographen ermöglicht. Dieses Modell basiert im Gegensatz zu den früher beschriebenen Methoden auf der Verwendung des Makrosphärenmodells. Das Makrosphärenmodell ist leicht anzuwenden und deshalb für die In-bore-Okklusion gut geeignet. Es induziert gut reproduzierbare fokale zerebrale Ischämien und ist mit der etablierten Fadentechnik bezüglich der Fehlerrate des Modells, der Läsionsgröße und -entwicklung sowie den resultierenden klinisch-neurologischen Defiziten vergleichbar.⁵⁰

Um eine erfolgreiche In-bore-Okklusion mit dem Makrosphärenmodell zu verifizieren, wurden schnelle diffusionsgewichtete Bildgebungssequenzen gewählt. Dadurch ließ sich der ADC des Wassers innerhalb der ischämischen Läsion messen. Der Abfall der ADC entsteht vermutlich durch die Wasserabwanderung aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment (zytotoxisches Ödem), welches durch das Ischämie-bedingte Versagen der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Pumpe begründet ist.^{14,27} Der Diffusionskoeffizient des Wassers fiel bereits innerhalb der ersten fünf Minuten nach Ischämieinduktion statistisch signifikant ab, was auf eine rasche Ausbildung eines zytotoxischen Hirnödems hindeutet. Dieses Phänomen wurde auch schon in früheren MRT-Studien beobachtet.^{33,38,126} So zeigten Moseley et al. bereits 1990 anhand von Untersuchungen an Katzen, dass innerhalb der ersten 30 Minuten einer fokalen Ischämie ein 30-50% Abfall des ADC auftritt. Pierpaoli et al. wiesen anhand eines Modells zur globalen zerebralen Ischämie einen ADC-Abfall schon innerhalb von 90 bis 150 Sekunden nach.¹²⁶

Während der hyperakuten Phase der Ischämie fiel der Diffusionskoeffizient kontinuierlich ab und blieb etwa ab der 45. Minute für die restliche Beobachtungsdauer konstant auf pathologisch niedrigem Niveau. Der prompte Abfall des ADC direkt nach der Injektion der Makrosphären zeigt, dass diese neu

entwickelte Technik zu einer schnellen und zuverlässigen Okklusion der A. cerebri media führt.

Im Gegensatz zu früheren in-bore-Okklusionsexperimenten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur das zytotoxische, sondern auch das vasogene Ödem quantifiziert. Das vasogene Hirnödeme entsteht durch eine Verschiebung von Wasser aus dem Intravasal- in den Extrazellularraum, was zu einer netto-Erhöhung der Flüssigkeitsmenge im Gewebe führt. Die Messung erfolgte anhand der Quantifizierung der T2-Relaxationszeit, die mit zunehmender Wassereinlagerung länger wird.⁷² Voraussetzung für die Entstehung des vasogenen Hirnödems ist eine pathologische Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke, die in der Frühphase unter anderem durch Zytokine, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und NO vermittelt wird. Frühere Arbeiten zeigten anhand von Farbstoffextravasationsexperimenten, dass dies typischerweise nach etwa 3 bis 6 Stunden zu erwarten wäre.^{13,17,75,107}

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit anhand eines sorgfältigen „pixel-by-pixel“-Vergleichs der prä- und postischämischen T2-Parameterbilder bereits ein signifikanter Anstieg der T2-Relaxationszeit während der ersten Messung nach Ischämieinduktion (20. bis 36. Minute), was auf eine weitaus frühere Ausbildung des vasogenen Hirnödems hindeutet als bisher angenommen wurde. Dieser Befund wird zusätzlich durch eine quantitativ nachweisbare Mittellinienverlagerung gestützt, die nur durch eine Volumenzunahme der betroffenen Hemisphäre erklärbar ist.

Die vorliegende Studie ist somit die erste, in der das Auftreten eines vasogenen Hirnödems zu einem so frühen Zeitpunkt beobachtet wurde. Möglicherweise ist die hier verwendete MRT-Technik gegenüber geringen Änderungen des Wassergehalts sehr empfindlich und daher früher als z.B. Farbstoffextravasationsexperimente in der Lage, Schädigungen der Blut-Hirnschranke zu detektieren.

Die Okklusion der A. cerebri media wurde durch eine post mortem Analyse nach 5 Stunden bestätigt. Vorzeitige Reperfusion, die als typische Komplikationen der Fadentechnik¹⁴² oder auch von „Clot-Embolisationsmodellen“¹⁶¹ beschrieben wurden, traten in dieser Studie nicht auf, da die Makrosphären -makroskopisch sichtbar- unverschieblich in den basalen Hirnarterien fixiert waren.

Diese Tatsache repräsentiert aber auch die größte Limitation dieses Modells, da die Makrosphärentechnik keine Reperfusion erlaubt. Das Makrosphärenmodell kann

somit nicht dazu dienen, die Pathophysiologie des Schlaganfalls unter den Voraussetzungen der Ischämie und Reperfusion zu studieren.

Das hier beschriebene In-bore-Okklusionsmodell weist aber auch Fehlerquellen auf, die berücksichtigt werden müssen. Bei einer von neun Ratten (ca. 11%) konnte durch das Makrosphärenmodell keine Ischämie induziert werden, obwohl die Makrosphären in den basalen zerebralen Arterien lokalisiert waren. Durch die Inspektion des Circulus arteriosus cerebri wurde bei diesem Tier eine anatomische Besonderheit in Form eines doppelt angelegten A. cerebri media-Hauptstammes aufgefunden. Die Makrosphären okkludierten den „proximalen“ A. cerebri media-Hauptstamm, nicht jedoch den Blutfluss von der A. cerebri anterior in den „distalen“ Hauptstamm. Diese anatomische Besonderheit tritt nach eigenen Erfahrungen bei ca. 2% der Tiere auf und stellt somit eine typische Fehlerquelle dar.

Eine weitere mögliche Komplikationsquelle betrifft den Katheter, der zur Applikation der Makrosphären in die A. carotis interna eingeführt wird. Kleine Blutgerinnsel an der Spitze dieses Katheters können die Passage der Makrosphären in die Arterie blockieren. Dieses Problem kann jedoch durch das Spülen des Katheters mit heparinisierte Kochsalzlösung (50-100IU/ml) effektiv vermieden werden. Auch Dislokationen des Katheters können auftreten, wenn das Tier in die Kopfhaltung des Kernspintomographen transferiert wird. Deshalb sollte der Katheter sehr tief in die A. carotis interna eingeführt werden und dort dreifach ligiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Makrosphärenmodell einen permanenten Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Kernspintomographen ermöglicht. Diese Technik ist leicht anzuwenden und weist eine hohe Reproduzierbarkeit sowie eine geringe Fehlerquote auf.

Diese in-bore Okklusionstechnik ermöglicht die Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge in der hyperakuten Phase fokaler zerebraler Ischämien. Mit diesem Verfahren konnte erstmals gezeigt werden, dass die Ausbildung des vasogenen Hirnödems weitaus früher als bislang angenommen auftritt.

8. Schlussfolgerung

Die Behandlung des akuten Hirninfarktes mit neuroprotektiven Substanzen gilt seit vielen Jahren als Erfolg versprechend. Dennoch konnte bisher in keiner der über 115

kontrollierten klinischen Studien ein signifikanter Effekt auf das Outcome von Schlaganfallpatienten dokumentiert werden. Die Ursachen für das Scheitern dieses therapeutischen Konzepts liegen neben dem Design der klinischen Studien und der Auswahl und Dosierung der getesteten Substanzen auch in der Durchführung der präklinischen Testungen in Tiermodellen, die hier als Bindeglied zwischen der Grundlagenforschung und der klinischen Anwendung fungieren.

In den vorliegenden Studien wurde aufgezeigt, dass das weit verbreitete Fadenmodell zum Verschluss der A. cerebri media an der Ratte zu einer Infarzierung des Hypothalamus mit daraus resultierender pathologischer Hyperthermie führt. Diese Nebenwirkung ist bei Hirninfarkten des Menschen unbekannt und ist durch eine zwischen Ratten und Menschen unterschiedliche Gefäßarchitektur bedingt. Diese über viele Jahre unzureichend beachtete Begleiterscheinung kann offensichtlich die Ergebnisse präklinischer Neuroprotektionsstudien erheblich beeinflussen. Dies wurde an der Beispielsubstanz Dizocilpin belegt, welche beim Einsatz der permanenten Fadenokklusionstechnik keinen signifikanten Effekt aufweist. Hypothalamusinfarkte und die daraus resultierende Hyperthermie konnten bei allen Tieren, die dem permanenten Fadenokklusionsmodell wurden, nachgewiesen werden. Dieser Nebeneffekt kann durch das Zurückziehen des Fadens nach 90 Minuten im Reperusionsmodell oder durch den Gebrauch des Makrosphärenmodells als permanentes Okklusionsmodell verhindert werden.

Ferner ist das Fadenmodell mit zahlreichen Komplikationen behaftet. Dazu zählen erfolglose Okklusionsversuche der A. cerebri media. Diese Tiere konnten aufgrund der klinischen Untersuchung nicht sicher identifiziert werden, da einige Ratten eine Hemiparese zeigten, obwohl nur eine ischämische Läsion des Zustromgebietes der A. choroidea anterior vorlag und die A. cerebri media nicht verschlossen war. Daher sollte durch zusätzliche Methoden, wie z.B. Magnetresonanz-Angiographie, die Okklusion der A. cerebri media überprüft werden.

Neben den fehlerhaften Okklusionen der A. cerebri media kommt es beim Einsatz des Fadenmodells häufig zu Gefäßperforationen, die zu Subarachnoidalblutungen führen. Dieser Nebeneffekt tritt bei der Verwendung des Makrosphärenmodells nicht auf.

Mit der Einführung des Makrosphärenmodells steht erstmals ein endovaskuläres Modell zum permanenten Verschluss der A. cerebri media zur Verfügung, mit dem die oben genannten Nebenwirkungen effektiv vermieden werden. Unter Verwendung

dieser Technik entfaltet Dizocilpin einen hochsignifikanten neuroprotektiven Effekt. Es ist daher anzunehmen, dass in der Vergangenheit zahlreiche aussichtsreiche Neuroprotektiva wegen modell-immanenter Nebenwirkungen der Fadentechnik falsch-negativ getestet wurden.

Ferner eignet sich das Makrosphärenmodell aufgrund seiner robusten Handhabbarkeit zur Ischämieinduktion unter erschwerten Bedingungen, wie zum Beispiel innerhalb des Magnetresonanztomographen. Damit eröffnet diese Technik neue Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge in der hyperakuten Phase zerebraler Ischämien.

Zahlreiche klinische Studien zeigen, dass die Gefäßpathologie bei akuten Schlaganfällen sehr heterogen ist. Neben Verschlüssen von Gefäßhauptstämme sind häufig auch Astverschlüsse und mikrovaskuläre Schädigungen für den akuten Hirninfarkt verantwortlich. Diese Gefäßokklusionen können dann als permanente Verschlüsse auftreten - ebenso häufig sind jedoch frühe und späte Spontanrekanalisationen sowie medikamentös induzierte Rekanalisationen.^{34,46,51} Entsprechend heterogen ist auch die dem Hirninfarkt zugrunde liegende Pathophysiologie, die sich bei permanenten Gefäßverschlüssen beispielsweise wesentlich von den Vorgängen während einer Ischämie-Reperfusionssituation unterscheiden („Reperfusionsschäden“).

Dieser Heterogenität der Gefäßbefunde und der resultierenden Pathophysiologie Rechnung zu tragen, stellt eine erhebliche Herausforderung für die präklinische Simulation humaner Schlaganfälle im Tiermodell dar. Unter diesem Gesichtspunkt sollten neue neuroprotektive Therapieverfahren mindestens mit zwei unterschiedlichen Tiermodellen getestet werden. Hier bietet sich das etablierte Fadenmodell zur Simulation einer frühen Reperfusion an, da die o.g. Nebenwirkungen dieses Modells erst bei längerdauernden Ischämiezeiten (>90 Minuten) auftreten. Zur Simulation permanenter Gefäßverschlüsse kann das neu entwickelte Makrosphärenmodell angewendet werden.^{60,150}

VI. Zusammenfassung

Der Schlaganfall stellt in den westlichen Industrieländern nach Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache dar und ist die häufigste erworbene Ursache für Behinderungen im Erwachsenenalter. In der Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung des akuten Schlaganfalls spielen tierexperimentelle Studien eine Schlüsselrolle und fungieren als Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung. Tiermodelle zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien sollten daher die Erkrankung des Schlaganfallpatienten möglichst genau abbilden, um eine Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten.

Derzeit gibt es verschiedene endovaskuläre und nicht-endovaskuläre Schlaganfallmodelle an der Ratte, von denen das so genannte Fadenmodell am häufigsten verwendet wird. Ein gravierender Nachteil dieser Technik liegt in der Induktion von Hypothalamusinfarkten die zu einer Störung der Thermoregulation führen. Dieses Phänomen tritt bei Menschen nicht auf und kann in Tierexperimenten zu erheblichen Ergebnisverfälschungen führen. Zur Vermeidung dieser Komplikation wurde das so genannte Makrosphärenmodell entwickelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation und Weiterentwicklung dieses neuen Modells, einschließlich der Charakterisierung möglicher Vor- und Nachteile im Vergleich mit den etablierten Verfahren.

Im ersten Experiment wurde die neuroprotektive Wirkung des NMDA-Antagonisten Dizocilpin (MK-801) an drei verschiedenen permanenten Ischämie-Modellen gegen Placebo getestet. Bei Verwendung des Fadenmodells traten bei fast allen Tieren Hypothalamusinfarkte auf, was mit einem signifikanten Anstieg der Körperkerntemperatur verbunden war. Bei Anwendung des Makrosphärenmodells blieb diese Komplikation aus. Die Behandlung mit Dizocilpin führte im Makrosphärenmodell zu einer 60-prozentigen Reduktion der Infarktgröße, während in dem etablierten Fadenmodell kein signifikanter neuroprotektiver Effekt zu beobachten war. Um sicherzustellen, dass diese Maskierung des neuroprotektiven Effekts von Dizocilpin tatsächlich auf die Induktion von Hypothalamusinfarkten und nicht etwa auf das andersgeartete Operationsverfahren zurückzuführen ist, wurde das Makrosphärenmodell so modifiziert, dass es -ähnlich wie das Fadenmodell- zu Verschlüssen der A. hypothalamica führte. In dieser dritten Gruppe erlitten die Tiere

Hypothalamusschädigungen und eine pathologische Hyperthermie. Dizocilpin führte hier zu keiner signifikanten Infarktreaktion.

Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, dass die Induktion von Hypothalamusinfarkten mit nachfolgender pathologischer Hyperthermie zur Maskierung potenziell neuroprotektiver Effekte führt. Diese Nebenwirkung des etablierten Fadenmodells kann durch den Einsatz der neuen Makrosphärentechnik effektiv verhindert werden.

In einer weiteren Studie wurden Art und Häufigkeit typischer Komplikationen und Fehlerquellen unterschiedlicher Okklusionsverfahren untersucht. Verglichen wurden das Fadenmodell zum permanenten Verschluss der MCA, das Fadenmodell zum transienten (90-minütigen) Verschluss und das Makrosphärenmodell. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie wurde die Zuverlässigkeit des angestrebten Gefäßbefundes (Verschluss oder Reperfusion der A. cerebri media) untersucht. Infarktausdehnung und die Häufigkeit von Blutungskomplikationen wurden magnetresonanztomographisch und histologisch ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis neurologischer Defizite bei Verwendung des Fadenmodells alleine keinen Beweis für eine erfolgreiche Okklusion der A. cerebri media darstellt, sondern durch zusätzliche Methoden, wie die MR-Angiographie, bestätigt werden sollte.

Eine weitere typische Komplikation des Fadenmodells ist das Auftreten von Subarachnoidalblutungen, die durch Perforationen hirnversorgender Arterien hervorgerufen werden. Diese Komplikation trat ausschließlich bei Verwendung des Fadenmodells, nicht jedoch bei Einsatz des Makrosphärenmodells auf.

Neben der Vermeidung zahlreicher Komplikationen des Fadenmodells erleichtert die Makrosphärentechnik Anwendungen unter technisch erschwerten Bedingungen, wie z.B. den Verschluss der A. cerebri media innerhalb des Magnetresonanztomographen. Diese sogenannte in-bore-Okklusion erlaubt die Untersuchung pathologischer Vorgänge in der hyperakuten Phase der fokalen zerebralen Ischämie. Dabei ist ein direkter („pixel-by-pixel“-) Vergleich zwischen den Baseline-Messungen und den postischämischen Tomogrammen möglich, da die Tiere zwischen den initialen und den Folgeaufnahmen nicht neu im Gerät positioniert werden müssen.

In-bore-Okklusionen sind prinzipiell mit der etablierten Fadentechnik möglich. Dieses Verfahren ist jedoch technisch kompliziert und mit hohen Fehlerraten behaftet. In der dritten Studie der vorliegenden Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten des Makrosphärenmodells zur in-bore-Okklusion untersucht.

Durch geringfügige Modifikationen des Makrosphärenmodells war diese Technik für den MCA-Verschluss innerhalb des Magnetresonanztomographen einsetzbar. Die Komplikationsrate lag mit 11% ähnlich hoch wie bei der Anwendung des Modells unter normalen Bedingungen.

Anhand diffusionsgewichteter Messungen konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung des zytotoxischen Hirnödems bereits innerhalb der ersten Minuten nach Verschluss der A. cerebri media nachweisbar ist. Bereits 20 Minuten nach Ischämiebeginn war auch ein signifikanter Anstieg der T2-Relaxationszeit als Ausdruck eines vasogenen Hirnödems nachweisbar. Dieser Befund kann als überraschend früher Verlust der Integrität der Blut-Hirnschranke interpretiert werden.

Zusammenfassend können mit dem Einsatz des Makrosphärenmodells typische Komplikationen der etablierten Fadenokklusionstechnik vermieden werden. Die so gewonnenen Ergebnisse bilden die klinische Situation von Schlaganfallpatienten realitätsgetreuer ab und ermöglichen so eine verbesserte Übertragbarkeit tierexperimentell gewonnener Daten auf den Menschen. Weitere Applikationsmöglichkeiten des Makrosphärenmodells wie die in-bore-Okklusion erlauben neue Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge der hyperakuten Phase fokaler zerebraler Ischämien.

Leider erlaubt das Makrosphärenmodell keine Reperfusionsexperimente. Dieser Umstand stellt die wichtigste Limitation dieser neuen Technik dar.

VII. Summary

Stroke is the third leading cause of death followed by ischemic heart disease and cancer and the leading cause of adult disability in the industrialized world. Animal studies serve as an important link between basic research and clinical application of emerging new neuroprotective treatments. Animal models for the induction of focal cerebral ischemia should imitate the disease pattern of stroke-patients as close as possible in order to improve transferability of the results to human stroke. Amongst several endovascular and non-endovascular rat stroke models available, the intraluminal suture technique is the most widely used method. One major disadvantage of this technique is the induction of hypothalamic injury that leads to disturbances of thermoregulation following stroke induction. This phenomenon is unknown in humans and can confound the results of animal studies. Recently, the “macrosphere model” was developed to avoid these side-effects.

Aim of the present study was to evaluate and improve this new technique and to characterize possible advantages and disadvantages in comparison to established stroke-models.

In the first experiment the neuroprotective effect of Dizocilpin (MK-801) was compared to placebo using three different permanent middle cerebral artery occlusion models. Using the suture-technique, hypothalamic injury occurred in all animals, which was accompanied by a significant increase in body temperature. This side-effect was avoided by using the macrosphere-model. Compared to placebo, Dizocilpin-treatment led to a significant reduction of infarct size (60%) in the macrosphere-group, whereas no significant neuroprotective effect could be demonstrated in the suture-group. In order to ensure that the failure of Dizocilpin-treatment in the suture-group is caused by induction of hypothalamic injury and pathological hyperthermia not potentially by differences in the operation-techniques, the macrosphere model was modified by increasing the number of spheres. This modification led to an occlusion of hypothalamic artery similar to the suture-model. Consequently, the animals developed hypothalamic injury and subsequent hyperthermia. As expected, Dizocilpin provided no significant neuroprotective effect in this group.

These results provide evidence that the induction of hypothalamic damage with subsequent pathological hyperthermia can obscure the effects of neuroprotective

drugs. This typical side-effect of the established suture-technique could be avoided by using the new macrosphere model.

Furthermore, typical side-effects and sources of error of the macrosphere-technique were investigated by comparison of the permanent suture-model, the transient suture-model (90 minutes) and the macrosphere-model. Using magnetic resonance angiography, the frequency of sufficient middle cerebral artery-occlusion (and reperfusion) was evaluated. Infarct size and the incidence of hemorrhagic complications were determined by using magnetic resonance imaging and histopathology. Neurological deficits were quantified clinically.

The results indicate that the presence of focal neurological deficits alone do not provide evidence for sufficient middle cerebral artery occlusion, since some animals displayed neurological deficits while MR-angiography proved that the occlusion technique failed to obstruct blood flow to the middle cerebral artery. Thus sufficient vessel occlusion needs to be verified in experimental stroke models by vascular imaging such as MR-angiography.

Subarachnoid hemorrhage represents another typical side-effect of the suture model. This complication is caused by perforation of intracranial arteries. In the present study, this side-effect occurred solely in animals that were subjected to the suture-technique, but not in animals of the macrosphere-group.

Due to its uncomplicated applicability, the macrosphere technique allows middle cerebral artery-occlusion even under difficult technical conditions, such as within the bore of a MR-tomograph (in-bore occlusion). This technique permits investigations of pathological changes in hyperacute phase of focal cerebral ischemia. Moreover, this method allows a direct ("pixel-by-pixel") comparison between pre and post ischemic images since animals do not need to be repositioned after baseline imaging.

Basically, in-bore occlusion can be achieved by modifying the established suture-technique. However, this procedure is technically challenging accompanied by a high failure-rate.

In the third experiment, the applicability of the macrosphere-model for in-bore occlusion was investigated. Minor technical modifications of the previously used macrosphere-technique facilitated middle cerebral artery-occlusion inside the MRI-

scanner. The complication rate was considerably low (11%) and comparable to the application of this model under normal conditions.

In this experiment, the development of cytotoxic brain edema was detectable within the first minutes following middle cerebral artery-occlusion. An increase in T2-relaxation time, that is indicative for vasogenic brain edema, could be detected as early as 20 minutes after induction of ischemia. This result indicated a surprisingly early breakdown of the blood-brain barrier.

In summary, application of the macrosphere-model avoids typical side-effects of the established suture-model. This new technique allows a closer simulation of the clinical situation of human stroke patients and thus improves the transferability of results derived from animal studies to human stroke. The macrosphere-model furthermore is suitable for in-bore occlusion experiments and thus facilitates investigation during the hyperacute phase of focal cerebral ischemia.

However, the macrosphere technique does not allow reperfusion. This circumstance represents the most important limitation of this otherwise promising new experimental technique.

VIII. Anhang

1. Materialien

1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

- ◆ Isotonische NaCl-Lösung 0,9 % (B. Braun AG, Melsungen)
- ◆ TTC (2,3,4,-Triphenyltetrazolium-Chlorid) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- ◆ Formalinlösung (10%; Roti[®] Histofix; Roth; Karlsruhe)

1.2. Medikamente

- ◆ Heparin-Na (Liquemin[®], N 25000, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- ◆ Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- ◆ Dizocilpin (MK-801; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Chemische Formel: C₁₆H₁₅NC₄H₄O₄

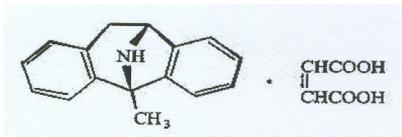


Abb.43: Strukturformel Dizocilpinemaleat (Quelle: Produktbeschreibung von Sigma[®])

1.3. Operationszubehör

- ◆ Chirurgisches Nahtmaterial (Perma-Hand[®]Seide ;Ethicon GmbH, Norderstedt)
- ◆ Chirurgisches Operationsbesteck (Aesculap[®] AG und CO.KG, Tuttlingen)
- ◆ Einmal-Injektions-Kanülen 0,45x12ml (Sterican[®]; B Braun, Melsungen)
- ◆ Lineal
- ◆ Polyethylenkatheter PE50 (Außendurchmesser 0,965mm, Innendurchmesser 0,58mm) (Intramedic[®]; Sparks, USA)
- ◆ Polyethylenkatheter PE20 (Außendurchmesser: 0,38mm, Innendurchmesser: 1,09mm) (Intramedic[®]; Sparks, USA)
- ◆ Silikonbeschichtete Fäden (Eigenherstellung):
Aus den Fäden (Ethilon[®], Ethicon GmbH, Norderstedt) wurden mehrere kleinere Fäden mit einer Länge von ca. 3,5 cm hergestellt. Anschließend wurde ein Ende der Fäden mit Hilfe eines LötKolbens erhitzt, so dass die Spitze stumpfer und

breiter wurde. Im Anschluss wurden die Fäden genau auf eine Länge von 3 cm gekürzt. Danach wurden sie mit Silikon (Provil[®] novo Light, Base und Catalyst; Heraeus, Deutschland) beschichtet

- ◆ Spritzen zu 1 und 2ml (B Braun, Melsungen)
- ◆ Stoppuhr (ETIC)
- ◆ TiO₂-Kugeln aus gesintertem Titanoxid, Durchmesser 0,315-0,355mm (BRACE GmbH, Alzenau)
- ◆ Vinyl-Handschuhe, unsteril, puderfrei (Transaflex; Bremen)

1.4. Versuchstiere

- ◆ 8-9 Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300 und 350g (Harlan Winkelmann GmbH, Borchten)

1.5. Geräte

1.5.1. Labor

- ◆ Blutgasanalysegerät (Chiron Diagnostics 865, Bayer[®], Leverkusen)
- ◆ Waage (BP 3100S; Sartorius AG, Göttingen)

1.5.2. Operationsgeräte

- ◆ Druckwandler
- ◆ Isofluranverdampfer (Sigma Elite Vaporizer; Penlon, Abingdon, UK)
- ◆ Kreislaufüberwachungsmonitor (Siemens Sirecust 1280)
- ◆ Untersuchungsmikroskop OPMI mit fahrbarem Bodenstativ S100 (Zeiss; Oberkochen)
- ◆ rektale Temperatursonde
- ◆ thermostatisch regulierendes Wasserfluss-System (Haake B3/C10; Haake)
- ◆ Wärmebrettkonstruktion mit einem Warmwasserdurchlauf mit eingebauter Narkosemaske (Eigenbau des Institutes)
- ◆ Wärmelampe

1.5.3. Magnetresonanztomographie

- ◆ Atemdrucksonde
- ◆ Hard- und Software:
 - Silicon Graphics-Rechner
 - Paravision 2.1.
- ◆ Kernspintomograph (Bruker PharmaScan 70/16, 7.0T, 16cm; Ettlingen, Deutschland)
- ◆ Rattenkunststoffhalterung mit Narkosezu- und ableitung (Eigenbau des Instituts)
- ◆ Rektale Temperatursonde
- ◆ thermostatisch regulierendes Wasserfluss-System (Haake)
- ◆ Volumenresonator

1.5.4. Gewebeuntersuchung

- ◆ Gefrierschrank
- ◆ Hard- und Software:
 - Flachbettscanner (ScanJet 3400C, Hewlett Packard[®], Deutschland; Auflösung 600x600dpi)
 - DELL-Rechner
 - Bildanalyse-Software (Image J 1,25s; National Institutes of Health, USA)
- ◆ Knochenfaßzange (Aesculap[®] AG und CO.KG, Tuttlingen)
- ◆ Parafilm „M“ (Peching Plastic packaging, Chicago)
- ◆ Rasierklingen (Techni Edge[®]; USA)
- ◆ Spatel (Aesculap[®] AG und CO.KG, Tuttlingen)
- ◆ Schere (Aesculap[®] AG und CO.KG, Tuttlingen)
- ◆ Vinyl-Handschuhe, unsteril, puderfrei (Transaflex; Bremen)
- ◆ Wasserbad

2. Abkürzungen

A.	Arterie
AA.	Arterien
ADC	apparent diffusion coefficient (Diffusionskoeffizient des Wassers)
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionsäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BV	gesamtes Gehirnvolumen
cAMP	zyklische Adenosin-Monophosphat
FWHM	Halbwertsbreite des Wassersignals
GABA	γ -Aminobuttersäure
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
HLV	hemispherales Läsionsvolumen
HLV _e	ödemkorrigiertes hemispherales Läsionsvolumen
HLV _u	unkorrigiertes hemispherales Läsionsvolumen
HV _c	contralaterales Hemisphärenvolumen
HV _i	ipsilaterales Hemisphärenvolumen
Hz	Hertz
IL-1 β	Interleukin-1 β
LV	Läsionsvolumen
MCA	A. cerebri media
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
ROI	regions of interest
r-tPA	rekombinanter „tissue-type“ Plasminogen Aktivator
TE	Echozeit
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TR	Repetitionszeit
TTC	2,3,4,-Triphenyltetrazolium-Chlorid

IX. Literaturverzeichnis

1. Agnati LF ZM, Kurosawa M. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. *Ital J Neurol Sci.* 1991;12:Ss.49-53.
2. Allegrini PR. Imaging. In: Krinke GJ (Hersg.). *The laboratory rat.* Stein, Schweiz: Academic Press; 2000:Ss.S. 277-282.
3. Arvin B NL, Barone FC, Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biohav Rev.* 1996;20:Ss.445-452.
4. Astrup J SL, Siesjö BK. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981;12:Ss.723-725.
5. Ayata C RA. Ischaemic brain edema. *J Clin Neurosci.* 2002;9:Ss.113-124.
6. Back T NM, Ginsberg MD. The ischemic penumbra: pathophysiology and relevance of spreading depressionlike phenomena. In: Ginsberg M. D. BJ (Hersg.). *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and management, vol 1.* Malden, MA: Blackwell; 1998:Ss.276-286.
7. Back Z KK, Hossmann KA. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCL-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:Ss.12-19.
8. Barone FC AB, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor Necrosis Factor-alpha. *Stroke.* 1997;28:Ss.1233-1244.
9. Beauchamp NJ, Jr., Barker PB, Wang PY, vanZijl PC. Imaging of acute cerebral ischemia. *Radiology.* 1999;212:Ss.307-24.
10. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 1986;17:Ss.1304-8.
11. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 1986;17:Ss.472-6.
12. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 1996;27:Ss.1616-22; discussion 1623.
13. Belayev L BR, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 1996;11:Ss.88-96.

14. Benveniste H, Hedlund LW, Johnson GA. Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke*. 1992;23:Ss.746-54.
15. Berrouschot J SM, Bettin S, Koster J, Schneider D. Mortality of space-occupying ("malignant") middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med*. 1998;24:Ss.620-623.
16. Besselmann M LM, Diedenhofen M, Franke C, Hoehn M. MR angiographic investigation of transient focal cerebral ischemia in rats. *NMR in Biomedicine*. 2001;14:Ss.289-296.
17. Betz AL CH. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke*. 1990;21:Ss.1199-1204.
18. Block F KC. Glutamatantagonisten in der Neurologie. *Nervenarzt*. 2001;72:Ss.393-405.
19. Block F, Schwarz M. [Neuroprotection in stroke. A critical overview]. *Nervenarzt*. 1999;70:Ss.101-10.
20. Böhme G. Zentralnervensystem. In: G B (Hersg.). *Nickel, Schummer, Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen*. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1992.
21. Brint S JM, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988;8:Ss.474-485.
22. Buchan A LH, Pulsinelli W. The N-methyl-D-aspartat antagonist, MK-801, fails to protect against neuronal damage caused by transient, severe, forebrain ischemia in adult rats. *J Neurosci*. 1991;11:Ss.1049-1056.
23. Buchan A PW. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 1990;10:Ss.311-316.
24. Buchan AM SA, Xue D. The effect of the NMDA receptor antagonist MK-801 on cerebral blood flow and infarct volume in experimental focal stroke. *Brain Res*. 1992;574:Ss.171-177.
25. Buchan AM XD, Slivka A. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke*. 1992;23:Ss.273-279.
26. Busch E KK, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res*. 1997;778:Ss.16-24.
27. Busza AL, Allen KL, King MD, van Bruggen N, Williams SR, Gadian DG. Diffusion-weighted imaging studies of cerebral ischemia in gerbils. Potential relevance to energy failure. *Stroke*. 1992;23:Ss.1602-12.

28. Cohen HP WA, Jacobson RL. Catecholamine content of cerebral tissue after occlusion or manipulation of middle cerebral artery in cats. *J Neurosurg.* 1975;42:Ss.32-36.
29. Corbett D ES, Thomas C, Wang D, Jonas RA. MK-801 reduced cerebral ischemic injury by inducing hypothermia. *Brain Res.* 1990;514:Ss.300-304.
30. Coyle P FX. Risk area and infarct area relations in the hypertensive stroke-prone. *Stroke.* 1993;24:Ss.705-710.
31. Dawson DA GD, McCulloch J, Macrae IM. Anti-ischaemic efficacy of a nitric oxide synthase inhibitor and a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in models of transient and permanent focal cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 1994;113:Ss.247-253.
32. De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A, Janssen PA. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke.* 1989;20:Ss.1383-90.
33. Decanniere C ES, Davis D, van Zijl PC. Correlation of rapid changes in the average water diffusion constant and the concentrations of lactate and ATP breakdown products during global ischemia in cats. *Magn Reson Med.* 1995;34:Ss.343-52.
34. del Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *Stroke.* 1998;29:Ss.4-11.
35. Dezsi L GJ, Hamar J, Sladky J, Karp A, Reivich M. Acute improvement in histological outcome by MK-801 following focal cerebral ischemia and reperfusion in the cat independent of blood Flow changes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:Ss.390-399.
36. Diener HC FM. *Schlaganfall.* Stuttgart: George Thieme Verlag; 2002.
37. Diepen R. Blutversorgung und Angioarchitektonik des Hypothalamus. In: Wilhelm Möllendorff WB (Hersg.). *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Teil 7: Der Hypothalamus.* Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag; 1962:Ss.178-181.
38. Dijkhuizen RM, de Graaf RA, Tulleken KA, Nicolay K. Changes in the diffusion of water and intracellular metabolites after excitotoxic injury and global ischemia in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:Ss.341-9.
39. Dirnagel U IC, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:Ss.391-397.
40. Duong TQ AJ, Ying HS, Neil JJ. Evaluation of extra- and intracellular apparent diffusion in normal and globally ischemic rat brain via 19F NMR. *Magn Reson Med.* 1998;40:Ss.1-13.

41. Engelhorn T DA, Kastrup A, Beaulieu C, de Crespigny A, Forsting M, Moseley ME, Faraci FM. Decompressive craniectomy, reperfusion, or a combination for early treatment of acute "malignant" cerebral hemispheric stroke in rats? Potential mechanisms studied by MRI. *Stroke*. 1999;30:Ss.1456-1463.
42. Feuerstein GZ LT, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994;6:Ss.341-360.
43. Fiebich JB SP. Moderne Kernspintechiken beim Schlaganfall. *Radiologe*. 2003;43:Ss.251-264.
44. Fisher M. Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke*. 2003;34:Ss.1539-46.
45. Fox G GD, Shevde S, Loftus J, Swayne G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke*. 1993;24:Ss.2087-2092.
46. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *Jama*. 1999;282:Ss.2003-11.
47. Furlan AJ, Katzan IL, Caplan LR. Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2003;5:Ss.171-180.
48. Furlow TW BN. Stroke in rats produced by carotid injection of sodium arachidonate. *Science*. 1975;187:Ss.658-660.
49. Gagliardi RJ. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arg Neuropsychiatr*. 2000;58:Ss.583-8.
50. Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, Fisher M. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods*. 2003;122:Ss.201-11.
51. Gerriets T, Postert T, Goertler M, Stolz E, Schlachetzki F, Sliwka U, Seidel G, Weber S, Kaps M. DIAS I: duplex-sonographic assessment of the cerebrovascular status in acute stroke. A useful tool for future stroke trials. *Stroke*. 2000;31:Ss.2342-5.
52. Gerriets T SE, König S, Babacan S, Fiss I, Jauss M, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: an early outcome predictor. *Stroke*. 2001;32:Ss.442-447.
53. Gerriets T SE, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M. Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion : adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke*. 2003;34:Ss.2234-9.
54. Gerriets T SE, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-

- occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2004;35:Ss.566-571.
55. Gill R FA, Woodruff G. Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J Neurosci*. 1987;7:Ss.3345-3349.
 56. Ginsberg M. D. BR. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989;20:Ss.1627-1642.
 57. Ginsberg MD, Busto R. Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. *Stroke*. 1998;29:Ss.529-34.
 58. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*. 2002;33:Ss.2123-36.
 59. Granger DN KP. Leukocyteendothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71:Ss.67-75.
 60. Green AR. Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:Ss.1030-4.
 61. Groggaard B SL, Gerdin B, Arfors KE. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;9:Ss.500-505.
 62. Gu WG BT, Jiang W, Wester P. A photothrombotic ring stroke model in rats with remarkable morphological tissue recovery in the region at risk. *Exp Brain Res*. 1999;125:Ss.171-183.
 63. Hacke W SS, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. "Malignant" middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol*. 1996;53:Ss.309-315.
 64. Hajat C HS, Sharma P. Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome: a meta-analysis of studies in patients. *Stroke*. 2000;31:Ss.410-414.
 65. Hallenbeck JM DA, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke*. 1986;17:Ss.246-253.
 66. Hamann G. Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiologe*. 1997;37:Ss.843-852.
 67. Harris NG, Zilkha E, Houseman J, Symms MR, Obrenovitch TP, Williams SR. The relationship between the apparent diffusion coefficient measured by magnetic resonance imaging, anoxic depolarization, and glutamate efflux during experimental cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:Ss.28-36.

68. He Z, Yamawaki T, Yang S, Day AL, Simpkins JW, Naritomi H. Experimental model of small deep infarcts involving the hypothalamus in rats: changes in body temperature and postural reflex. *Stroke*. 1999;30:Ss.2743-51; discussion 2751.
69. Heiland S SK. Magnetresonanztomographie beim Schlaganfall-Methodische Grundlagen und klinische Anwendung. *Fortschr Röntgenstr.* 1999;171(1):Ss.3-14.
70. Henshall DC BS, Sharkey J. A rat model of endothelin-3-induced middle cerebral artery occlusion with controlled reperfusion. *Brain Res.* 1999;843:Ss.105-111.
71. Hockenberry D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 1995;146:Ss.16-19.
72. Hoehn M, Nicolay K, Franke C, van der Sanden B. Application of magnetic resonance to animal models of cerebral ischemia. *J Magn Reson Imaging.* 2001;14:Ss.491-509.
73. Hossmann K-A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research.* 1998;39:Ss.106-120.
74. Hossmann K-A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 1994;36:Ss.557-565.
75. Huang ZG XD, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci.* 1999;26:Ss.298-304.
76. Iadecola C ZF, Casey R, Ross ME. Knockout mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene are resistant to cerebral ischemia. *Soc Neurosci Abstr* 22. 1996:Ss.1693.
77. Iadecola C ZF, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:Ss.378-384.
78. Jovin TG WL. Acute stroke. In: Babikian VL WL, Higashida RT (Hersg.). *Imaging cerebrovascular disease*. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 2003:Ss.173-188.
79. K. Minematsu MF. MK-801 reduces extensive infarction after suture middle cerebral artery occlusion in rats. *Cerebrovasc Dis.* 1993;3:Ss.99-104.
80. Kaneko D NN, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model. *Stroke.* 1985;16:Ss.76-84.
81. Kawamura S YN, Shirasawa M, Fukasawa H. Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1991;109:Ss.126-132.
82. Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci.* 2002;5:Ss.1039-42.

83. Kogure K BR, Scheinberg P, Reinmuth OM. Energy metabolites and water content in rat brain during early stage of development of cerebral infarction. *Brain*. 1974;97:Ss.103-114.
84. Kohno K, Back T, Hoehn-Berlage M, Hossmann KA. A modified rat model of middle cerebral artery thread occlusion under electrophysiological control for magnetic resonance investigations. *Magn Reson Imaging*. 1995;13:Ss.65-71.
85. Koizumi J YY, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986;8:Ss.1-8.
86. Kudo M AA, Ichimori S, Fukunaga N. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke*. 1982;13:Ss.505-508.
87. Kuge Y MK, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1995;26:Ss.1655-1658.
88. Lachmann LB BD, Dinarello CA. Growth promoting effect of recombinant IL-1 and TNF for human astrocyte cell line. *J Immunol*. 1987;138:Ss.2913-2916.
89. Laing RJ JJ, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats: which method works best? *Stroke*. 1993;24:Ss.294-297.
90. Legos JJ MA, Read SJ, Campbell CA, Irving EA, Roberts J, Barone FC, Parsons AA. Programmable microchip monitoring of post-stroke pyrexia: effects of aspirin and paracetamol on temperature and infarct size in the rat. *J Neurosci Methods*. 2002;113:Ss.159-166.
91. Leker RR CS. Experimental models in focal cerebral ischemia: Are we there yet? *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 2002;83:Ss.55-59.
92. Li F, Han S, Tatlisumak T, Carano RA, Irie K, Sotak CH, Fisher M. A new method to improve in-bore middle cerebral artery occlusion in rats: demonstration with diffusion- and perfusion-weighted imaging. *Stroke*. 1998;29:Ss.1715-9; discussion 1719-20.
93. Li F LK, Silva MD, Meng X, Gerriets T, Helmer KG, Fenstermacher JD, Sotak CH, Fisher M. Acute postischemic renormalization of the apparent diffusion coefficient of water is not associated with reversal of astrocytic swelling and neuronal shrinkage in rats. *Am J Neuroradiol*. 2002;23:Ss.180-188.
94. Li F, Omae T, Fisher M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke*. 1999;30:Ss.2464-70; discussion 2470-1.
95. Li Y CM, Jiang N, Yao F, Zaloga C. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:Ss.389-397.
96. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:Ss.399-415.

97. Löffler G. Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G PP (Hersg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1997:Ss.495-520.
98. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:Ss.84-91.
99. Loubinoux I, Volk A, Borredon J, Guirimand S, Tiffon B, Seylaz J, Meric P. Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T2 magnetic resonance imaging. *Stroke*. 1997;28:Ss.419-26; discussion 426-7.
100. Lyden PD ZJ, Chabolla DR, Jacobs MA, Gage FH,. Quantitative effects of cerebral infarction on spatial learning rats. *Exp Neurol*. 1992;116:Ss.122-132.
101. Margaille I, Parmentier S, Callebert J, Allix M, Boulu RG, Plotkine M. Short therapeutic window for MK-801 in transient focal cerebral ischemia in normotensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:Ss.107-13.
102. Matsuno H UT, Umemura K, Takiguchi Y, Asai Y, Muranaka Y, Nakashima M. A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. *JPM*. 1993;29:Ss.165-173.
103. Matsushima K HA. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke*. 1995;26:Ss.1047-1052.
104. McCulloch J. Glutamate receptor antagonists in cerebral ischaemia. *J Neural Transm*. 1994;43:Ss.71-79.
105. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res*. 1992;89:Ss.67-78.
106. Memezawa H, Zhao Q, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (MK-801) in focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 1995;670:Ss.48-52.
107. Menzies SA BA, Hoff JT. Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema. *J Neurosurg*. 1993;78:Ss.257-266.
108. Milton AS. The hypothalamus and the pharmacology of thermoregulation. In: B. Cox IDM, A.H. Weston (Hersg.). *Pharmacology of the hypothalamus*. Baltimore: University Park Press; 1978:Ss.105-134.
109. Möbius H. Memantine: update on the current evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003;18:Ss.47-54.
110. Mohamed AA GO, Graham DI, Osborne KA, McCulloch J, Mendelow AD, Teasdale GM, Harper AM. Effect of pretreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol*. 1985;18:Ss.705-711.

111. Monaghan DT BR, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1989;29:Ss.365-402.
112. Morimoto T GM, Busto R, Martinez E, Ginsberg MD. Simultaneous measurement of salicylate hydroxylation and glutamate release in the penumbral cortex following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:Ss.92-99.
113. Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, Wendland MF, Weinstein PR. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med.* 1990;14:Ss.330-46.
114. Muir KW, Grosset DG. Neuroprotection for acute stroke: making clinical trials work. *Stroke.* 1999;30:Ss.180-2.
115. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1989;20:Ss.1037-43.
116. Nathan C XQ-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 1994;78:Ss.915-918.
117. Neumann-Haefelin T, Kastrup A, de Crespigny A, Yenari MA, Ringer T, Sun GH, Moseley ME. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, and edema formation. *Stroke.* 2000;31:Ss.1965-72; discussion 1972-3.
118. Nickel R SA, Seiferle E. Nervensystem. In: Nickel R SA, Seiferle E (Hersg.). *Nickel, Schummer, Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen.* Stuttgart: Verlag Paul Parey; 1992:Ss.2-385.
119. Obrenovitch TP UJ. Altered glutamateric transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Prog Neurobiol.* 1997;51:Ss.39-87.
120. Okuyama K, Kiuchi S, Okamoto M, Iwasaki H, Narita H, Kudo Y. Time-dependent changes in the ischemic forebrain following the microsphere-induced permanent occlusion of cerebral arterioles in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1998;78:Ss.31-7.
121. Oliff HS WE, Eilon G, Marek P. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 1995;675:Ss.20-26.
122. Osuga H HA. Relevance of interstitial glutamate to selective vulnerability in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:Ss.343-347.
123. Overgaard K ST, Boysen G, Pedersen H, Hoyer S, Diemer NH. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:Ss.484-490.

124. Padosch SA VP, Böttiger BW. Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. *Anaesthesist*. 2001;50:Ss.905-920.
125. Peters O BT, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:Ss.196-205.
126. Pierpaoli C, Alger JR, Righini A, Mattiello J, Dickerson R, Des Pres D, Barnett A, Di Chiro G. High temporal resolution diffusion MRI of global cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:Ss.892-905.
127. Prado R GM, Dietrich WD, Watson BD, Busto R. Hyperglycemia increases infarct size in collaterally perfused but not end-arterial vascular territories. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988;8:Ss.186-192.
128. Quagliarello VJ WB, Long WJ, Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood brain barrier injury in the rat. *J Clin Invest*. 1991;87:Ss.1360-1366.
129. Raab C. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1996;27:Ss.151.
130. Reese T BD, Sauter A, Beckmann N, Rudin M. Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR in Biomedicine*. 1999;12:Ss.189-196.
131. Robinson RG. Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat. *Science*. 1979;205:Ss.707-10.
132. Robinson RG SW, Schlumpf M, Valk T, Bloom FE. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature*. 1975;255(5506):Ss.332-4.
133. Röther J. "Spreading depression" und Periinfarktdepolarisationen. *Nervenarzt*. 2000;71:Ss.84-90.
134. Rother J, de Crespigny AJ, D'Arceuil H, Mosley ME. MR detection of cortical spreading depression immediately after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:Ss.214-20.
135. Roussel SA, van Bruggen N, King MD, Houseman J, Williams SR, Gadian DG. Monitoring the initial expansion of focal ischaemic changes by diffusion-weighted MRI using a remote controlled method of occlusion. *NMR Biomed*. 1994;7:Ss.21-8.
136. Saito K SK, Nishida K, Sei Y, Basile A. Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett*. 1996;206:Ss.149-152.
137. Sakamoto N K, Kato H, Ohtomo H. Disturbed Ca²⁺ homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res*. 1986;364:Ss.372-376.

138. Saper CB. Neurobiological basis of fever. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;856:Ss.90-4.
139. Sato PH HE. Tirilazad protects vitamins C and E in brain ischemia-reperfusion injury. *J Neurochem.* 1992;58:Ss.2263-2268.
140. Schaller B GR. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24:Ss.351-371.
141. Schellinger PD, Fiebich J, Ringleb PA, Jansen O, Hacke W. Thrombolysis in cerebral ischemia. An overview. *Nervenarzt.* 2001;72:Ss.590-9.
142. Schmidt-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke.* 1998;29:Ss.2162-70.
143. Schwab S ST, Aschoff A, Schwarz S, Steiner HH, Jansen O, Hacke W. Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. *Stroke.* 1998;29:Ss.1888-1893.
144. Scremin OU. Cerebral vascular system. In: Paxinos G (Hersg.). *The rat nervous system: second edition.* Sydney, Australien: Academic Press; 1995:Ss.3-35.
145. Sharkey J BS. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods.* 1995;60:Ss.125-131.
146. Siesjö B. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: pathophysiology. *J Neurosurg.* 1992;77:Ss.169-184.
147. Skalej M HS. Magnetresonanztomographie (MRT). In: K S (Hersg.). *Neuroradiologie.* Stuttgart, New York: George Thieme Verlag; 1996:Ss.12-18.
148. Small DL, Buchan AM. Animal models. *Br Med Bull.* 2000;56:Ss.307-17.
149. Spera PA EJ, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett.* 1998;251:Ss.189-192.
150. (STAIR) STAIRT. Recommendation for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke.* 1999;30:Ss.2752-2758.
151. (STAIRII) STAIRTI. Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke.* 2001;32:Ss.1598-606.
152. Starke K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystem. In: W. Forth DH, W. Rummel, K. Starke (Hersg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag; 1998:Ss.S. 121-123.

153. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG, 3rd, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci.* 1997;153:Ss.8-11.
154. Tamura A GD, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by (14C)iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1:Ss.61-69.
155. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1:Ss.53-60.
156. Töndury G KS. Gestalt und Gliederung des Gehirns. In: H. Leonhardt GT, K. Zilles (Hersg.). *Rauber, Kopsch: Anatomie des Menschen Lehrbuch und Atlas, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane.* Stuttgart, New York: George Thieme Verlag; 1987:Ss.119-173.
157. Töndury G KS, Krisch B. Hirnhäute und Hirngefäße. In: H. Leonhardt GT, K. Zilles (Hersg.). *Rauber, Kopsch: Anatomie des Menschen Lehrbuch und Atlas, Band 3: Nervensystem, Sinnesorgane.* Stuttgart, New York: George Thieme Verlag Stuttgart; 1987:Ss.S. 175-233.
158. Tyson GW TG, Graham DI, McCulloch J. Focal cerebral ischemia in the rat: Topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann Neurol.* 1984;15:Ss.559-567.
159. Uno M MK, Wallace MC. Neutral red staining for assessment of acute outcome in rat focal ischemia models. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1995;35:Ss.561-566.
160. Vise WM SF, Hossmann K-A, Takagi S, Zülch KJ. Cerebral microembolization. I.Pathophysiological studies. *Arch Neurol.* 1977;34:Ss.660-665.
161. Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 2001;109:Ss.147-51.
162. Watson BD DW, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol.* 1985;17:Ss.497-504.
163. Wester P WB, Prado R, Dietrich WD. A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke.* 1995;26:Ss.444-450.
164. Wiebers DO AH, Whisnant JP. Animal models of stroke: Are they relevant to human disease? *Stroke.* 1990;21:Ss.1-3.
165. Woitzik J SL. Control of completeness and immediate detection of bleeding by a single laser-Doppler flow probe during intravascular middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Meth.* 2002;122:Ss.75-78.

166. Yang G CP, Chen SF, Babuna OA, Simon RP, Weinstein PR. Reduction of vasogenic edema and infarction by MK-801 in rats after temporary focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1994;34:Ss.339-345.
167. Yao H GM, Watson BD, Prado R, Dietrich WD, Kraydieh S, Busto R. Failure of MK-801 to reduce infarct volume in thrombotic middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1993;24:Ss.864-870.
168. Yao H IS, Sugimori H, Fujii K, Fujishima M. Simplified model of krypton laserinduced thrombotic distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 1995;27.
169. Zhang RL CM, Zhang ZG, Jiang Q, Ewing JR. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res*. 1997;766:Ss.83-92.
170. Zhang Z ZR, Jiang Q, Raman SBK, Cantwell L, Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:Ss.125-135.
171. Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res*. 1994;649:Ss.253-9.

X. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. med. Georg Bachmann für die Möglichkeit diese Promotion an der Kerckhoff-Klinik durchzuführen und für seine gute Betreuung im Verlauf der letzten 2,5 Jahre
- Herrn Prof. Dr. med. Manfred Kaps, der mir diese Promotion seitens des Universitätsklinikums ermöglicht hat
- Herrn Prof. Dr. med. vet. Eigenbrodt (†) und Herrn PD Dr. med. vet. J. Roth für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen
- Herrn Dr. med. Tibo Gerriets für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, die intensive Betreuung und den unentwegten Ansporn während des experimentellen Teils, sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit
- Herrn Dr. Clemens Müller für die Einführung in die „geheime Welt der MR-Technik“
- Der Kerckhoff-Klinik GmbH und dem Universitätsklinikum Giessen für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Erstellung dieser Doktorarbeit sowie zur Teilnahme an Fortbildungen
- Den Herren Sigfried Langsdorff und Christoph Bingel für die Hilfe bei der Erstellung für den experimentellen Teil essentieller Utensilien
- Dr. med. Carina Röttger und Dr. med. Jens Allendörfer für hilfreiche Utensilien zur Erstellung der Doktorarbeit und die netten Kaffeepausen
- Dr. Matthias Heil für die Hilfe bei der Beseitigung von Computer- oder Softwareproblemen
- Meinen tollen Eltern für ihre immer währende Unterstützung, die weit über meine Schulausbildung und das Studium hinausging
- Meinen Großeltern für ihre Hilfe während des Studiums und der Zeit danach
- Meinem lieben Michael, der mir immer zur Seite stand und mich unterstützt hat

ISBN 3-938026-44-8



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>