

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Mit der Etablierungsstudie wurde ein Modell zur Auslösung eines hämodynamischen Schlaganfalls auf Basis einer persistierenden Hypoperfusion des Gehirns der Ratte entwickelt. Dazu wurde nach Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO) der Blutdruck für fünfzehn bis dreißig Minuten gesenkt. In der Behandlungsstudie wurde in dem entwickelten Modell die arteriogene Wirkung von GM-CSF bei einwöchiger Behandlung untersucht. Die Darstellung des Schlaganfalls erfolgte über die Messung des regionalen ATP-Gehalts und des zerebralen Blutflusses (CBF).

### **3.2 Material und Methoden**

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts zwischen der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Forschergruppe für experimentelle und klinische Arteriogenese, Medizinische Klinik, Freiburg i. Brsg. und dem Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Abteilung für experimentelle Neurologie, Köln realisiert. Die Durchführung der Experimente fand in der Zeit von Mai 2002 bis September 2003 im Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Abteilung für experimentelle Neurologie in Köln statt.

#### **3.2.1 Versuchstiere**

Die Tierexperimente wurden an männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Sie wurden über die Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln bezogen. Die Tiere waren ca. 8 - 12 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 300 - 400 g.

##### ***3.2.1.1 Haltungsbedingungen***

Die Tiere wurden zu zweit in Standardkäfigen von 40 cm x 24 cm x 15 cm mit einer Späneeinstreu gehalten. Standard-Rattenzuchtfutter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur lag bei 20 - 22 °C, die Luftfeuchtigkeit bei 50 - 60 %. Eine künstliche Beleuchtung sorgte für einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

##### ***3.2.1.2 Tierversuchsgenehmigung***

Für die vorliegende Studie lag gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes eine Genehmigung der Bezirksregierung Köln, Aktenzeichen 23.203.2-K 33, 1/01 und 50.203.2-K 33, 12/03 zur Durchführung der „Auswirkung von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-) auf die Kollateralgefäßbildung im Gehirn nach extrakraniellm Arterienverschluss“ sowie der „Auswirkung von GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) auf die Kollateralgefäßbildung im Gehirn nach extrakraniellm Arterienverschluss im hypotensiven Infarktmodell“ vor.

### 3.2.1.3 Tiergruppeneinteilung

Aus der Dauer der Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO), der Dauer und Tiefe der Hypotension sowie der Behandlung (vgl. 3.2.2) ergaben sich folgende Tierversuchsgruppen und Tierversuchszahlen:

<u>Versuchsreihe</u>	<u>Gruppenbezeichnung</u>	<u>Tieranzahl</u>
Etablierungsstudie	1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg	9
	7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	7
	7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	4
	7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	4
	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	4
	7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	4
Behandlungsstudie	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	22
	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	20
	Kontrolle	4
	1 h 3-VO	4
	7 d 3-VO / GM-CSF	8
	7 d 3-VO / Ringer	6

### 3.2.1.4 Randomisierung

Für die Behandlungsstudie wurde jeweils am Morgen des ersten Operationstages ausgelost, ob das Tier eine Behandlung mit GM-CSF oder Ringerlösung erhalten sollte (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer; 7 d 3-VO / GM-CSF; 7 d 3-VO / Ringer).

Bei den Tieren für die akuten Blutflussmessungen wurde jeweils vorher ausgelost, ob es sich um ein Normaltier ohne 3-VO (Kontrolle) oder ein Tier mit einstündiger 3-VO (1 h 3-VO) handeln sollte.

## 3.2.2 Tierexperimentelle Operationen

Für die beiden Studien wurden unterschiedliche tierexperimentelle Operationen durchgeführt.

### Etablierungsstudie

Mit Hilfe dieser Studie soll ein neues Infarktmodell etabliert werden, bei dem auf Basis einer persistierenden Hypoperfusion des Gehirns ein Schlaganfall durch Senkung des arteriellen Blutdrucks erzeugt werden soll. Um den Grad der erforderlichen Blutdruckabsenkung zu ermitteln, wurde die Studie mit insgesamt 32 Tieren durchgeführt. Bei unterschiedlichen Zeiten (15 bis 30 min) wurde der Blutdruck am zweiten Operationstag auf ein unterschiedliches Niveau (50 bis 20 mmHg) gesenkt, um so den Blutdruck-Zeit-Bereich zu erreichen, bei dem ein ipsilateraler ATP-Verlust im Gehirn der Tiere auftritt. Während des Zeitraums zwischen Drei-Gefäß-Okklusion und induzierter Hypotension erfolgte keine Behandlung der Tiere.

### Behandlungsstudie

In der Behandlungsstudie wurden die Tiere, die zur Untersuchung im hypotensiven Inafarktmodell vorgesehen waren, in zwei Gruppen eingeteilt. Während eine Gruppe während

der ersten Operation eine subkutane Injektion von GM-CSF (Leucomax 300, Schering-Plough (Brinny) Co., Irland; Dosierung:  $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; Injektionsvolumen 0,2 ml) erhielt (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF), erhielten die Tiere der zweiten Gruppe nur eine subkutane Injektion von 0,2 ml Ringerlösung (Ringer-Infusionslösung Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer). Weitere Injektionen fanden für beide Gruppen jeden zweiten Tag statt. Sieben Tage nach 3-VO wurde ein hämodynamischer Schlaganfall erzeugt und anschließend entweder ATP oder der zerebrale Blutfluss mittels Autoradiographie gemessen.

Um einen Vergleich für die autoradiographischen Blutflussmessungen zu haben, wurden zusätzlich Ratten ohne 3-VO und Hypotension (Kontrolle), Ratten direkt nach 3-VO (1 h 3-VO) sowie Ratten sieben Tage nach 3-VO (7 d 3-VO / GM-CSF; 7 d 3-VO / Ringer) untersucht.

### 3.2.2.1 Zeitlicher Ablauf

#### Etablierungsstudie

Tag 0: 3-VO

Tag 7: hypovolämische Hypotension, *funnel-freezing*

#### Behandlungsstudie

Tag 0: 3-VO

Tag 0, 2, 4, 6: Behandlung

Tag 7: für ATP-Messung: hypovolämische Hypotension, *funnel-freezing*

für CBF-Messung: hypovolämische Hypotension,  $^{14}\text{C}$ -Iodantipyriminfusion, Tötung durch KCl i.v.

### 3.2.2.2 Narkose

Bei allen chirurgischen Eingriffen erfolgte die Einleitung der Narkose mit 4 % Halothan (Halothan Eurim, Eurim-Pharm, Piding; Halothan-Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck) in einem Lachgas-Sauerstoff-Gemisch (70 % / 30 %). Nach Einsetzen der Narkose wurde das Tier auf den Operationstisch umgelagert sowie die Narkose mit 1 - 1,5 % Halothan über eine Atemmaske aufrecht erhalten.

Während der Operation zur Erzeugung der Drei-Gefäß-Okklusion blieben die Tiere spontanatmend. Zur Operation zur Erzeugung einer Hypotension sowie zur Messung des zerebralen Blutflusses wurden die Tiere tracheotomiert, um sie kontrolliert zu beatmen (Kleintierrespirator, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Dazu wurde nach medianem Hautschnitt ventral am Hals die Trachea freipräpariert. Unter einer Injektion von Pancuronium ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; Pancuronium 'Organon<sup>®</sup>', Organon Teknika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim) zur Muskelrelaxation wurde die Trachea eröffnet, ein ca. 15 mm langer Plastiktubus (Portex Polyethylene Tubing, ID 2,0 mm, Portex, Hythe, Kent, Großbritannien) eingeführt und an den Respirator angeschlossen. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 0,5 - 0,7 ml bei einer Atemfrequenz von 25 - 30  $\text{min}^{-1}$ . Die Trachea wurde kranial des eingeführten Tubus mit einem Faden (Seide; 1,5 metric; Serag Wiessner, Naila) ligiert. Die Pancuronium-Injektion wurde je nach Bedarf wiederholt. Über wiederholte Blutgasanalysen (238 pH/blood gas analyser, Ciba Corning Diagnostics GmbH, Fernwald) wurden die Parameter arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ), Kohlendioxidpartialdruck ( $\text{PaCO}_2$ ) und der Blut-pH kontrolliert. Die Blutentnahme erfolgte über die A. femoralis. Vor

Einleitung der Hypotension bzw. der Blutflussmessung wurde ein PaCO<sub>2</sub> von 40 mmHg angestrebt.

Mit einer rektal eingeführten Sonde wurde die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und mittels rückgekoppelter Heizplatte bei  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  gehalten.

### **3.2.2.3 Blutflussmessung mittels Laser-Doppler**

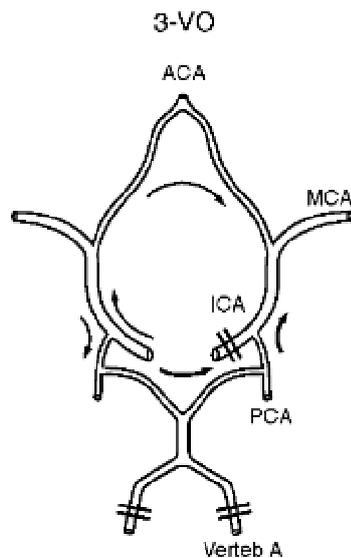
Kontinuierliche Messungen der lokalen Durchblutung in den Versorgungsgebieten der intrakraniellen Hirnarterien wurden mit einer topographischen Laser-Doppler-Fluss(LDF)-Messung bei den Tieren durchgeführt (PeriFlux System 5000, PeriMed, Järfalla, Schweden), bei denen die Infarktdarstellung über die ATP-Messung erfolgen sollte. Das Funktionsprinzip basiert auf dem so genannten Doppler-Effekt. Dieser bezeichnet eine scheinbare Frequenz- bzw. Wellenlängenveränderung einer Welle bei einer Relativbewegung von Quelle und Empfänger.

Zur Blutflussmessung basierend auf dem Doppler-Effekt dringt ein monochromatischer Laserstrahl, der über ein Glasfaserkabel in einen Sondenkopf geleitet wird, nach Aufsetzen der Sonde auf den Schädelknochen in den Schädel und die peripheren Hirnareale ein. Er wird durch die zirkulierenden Erythrozyten unter Frequenzverschiebung reflektiert, vom Sondenkopf registriert und über das Glasfaserkabel zurückgeleitet. Aus Frequenzspektrum und Signalstärke wird ein Wert kalkuliert, der proportional zum Erythrozytenfluss ist. Somit sind nicht die absolut gemessenen Werte, sondern die relativen Änderungen in Bezug auf den Ausgangswert während einer Messung entscheidend (FABRICIUS und LAURITZEN, 1996). Zur Berechnung des genauen Blutflusses sind weitere Messgrößen wie Gefäßdurchmesser und Knochendicke notwendig.

Die LDF-Messungen wurden ipsilateral zur ligierten A. carotis communis während der Drei-Gefäß-Okklusion und beidseits während der hypovolämischen Hypotension durchgeführt. Dazu wurden im Bereich der Fossa temporalis in der Mitte zwischen Augenwinkel und Ohransatz zuerst die Haut und Unterhaut und dann mittels bipolarer Pinzette der M. temporalis bis auf den Knochen durchtrennt. Zur Ableitung des LDF genügt eine freigelegte Knochenfläche mit einem Durchmesser von etwa 0,5 cm. Die LDF-Abnahmesonde wurde direkt auf den temporalen Schädelknochen aufgebracht und ihre Position nicht mehr verändert. Die ermittelten LDF-Werte wurden aufgezeichnet und mit einer speziellen Computersoftware (PeriSoft, Perimed, Järfalla, Schweden) ausgewertet. Somit konnten relative Veränderungen der Laser-Doppler-Fluss-Messung zur Beurteilung der zerebralen Blutversorgung verwendet werden. Die Flussänderungen sind in Prozent des Ausgangswertes angegeben.

### **3.2.2.4 Drei-Gefäß-Okklusion**

Die Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO) wird erstmals von KATAWA et al. erwähnt (KAWATA et al., 1996) und von BUSCH et al. zur Untersuchung der zerebralen Arteriogenese genutzt (BUSCH et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Durchführung einer Drei-Gefäß-Okklusion nach BUSCH et al. (2003). Dabei wird ähnlich dem Vorgehen zur Induktion eines Vier-Gefäß-Verschlusses (PULSINELLI und BRIERLEY, 1979; PULSINELLI et al., 1983) eine chronische zerebrale Unterversorgung durch Okklusion von drei der vier großen extrakraniellen hirnzuführenden Gefäßen erwirkt.



**Abb. 4:** Drei-Gefäß-Okklusion (BUSCH et. al., 2003)

Schematische Darstellung des Kollateralblutflusses über den Circulus arteriosus Willisii der Ratte nach Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO).

ACA: A. cerebialis anterior; MCA: A. cerebialis media; ICA: A. carotis interna; PCA: A. cerebialis posterior; Verteb A: A. vertebralis

Im stereotaktischen Gerät erfolgte die Fixierung des Schädels über zwei Metallstäbe, die vorsichtig in den Meatus acusticus externus platziert wurden. Direkt hinter dem Os occipitale wurde ein mittiger, ca. 1 cm langer Schnitt über dem ersten und zweiten Halswirbelkörper angelegt. Haut und Unterhaut sowie die Mm. semispinalis capitis et longissimus capitis wurden durchtrennt. Mittels Wundspreizer wurde die Wunde geöffnet und die Mm. rectus capitis dorsalis major et rectus capitis dorsalis minor stumpf vom ersten Wirbelkörper abgetrennt, um die Foramina alare freizupräparieren. Beidseits wurde mit einer Koagulationssonde von 0,45 mm Durchmesser (ERBE Elektromedizinbedarf GmbH, Tübingen) in das Foramen alare eingegangen und die A. vertebralis durch Elektrokoagulation (5 Watt; Erbotom ICC50, ERBE Elektromedizinbedarf GmbH, Tübingen) verschlossen. Mittels dreischichtiger Muskel-Hautnaht (Seide; 1,5 metric; Serag Wiessner, Naila) wurde die Wunde verschlossen.

Zur Okklusion der A. carotis communis sinistra wurde über einen medianen Zugang im ventralen Halsbereich das Gefäß unter Schonung umgebender Nerven freigelegt, mit einem nicht-resorbierbaren Faden (Seide; 1,5 metric; Serag Wiessner, Naila) umschlungen und permanent ligiert. Während der Ligation wurde die ipsilaterale LDF-Ableitung aufgezeichnet. Durch Einzelhefte wurde die Haut am Hals und am Kopf anschließend verschlossen (Seide; 1,5 metric; Serag Wiessner, Naila).

Zur Minderung des postoperativen Schmerzes wurden die Operationszugänge mit einem Lokalanästhetikum (Bupivacain-RPR<sup>®</sup> 0,5%; A. Nattermann & Cie. GmbH, Köln) unterspritzt. Nachdem die Tiere aus der Narkose erwacht waren, wurden sie in Zweier-Gruppen in Standardkäfigen bei freiem Futter- und Wasser-Zugang gehalten.

### 3.2.2.5 Hypovolämische Hypotension

Um einen hämodynamisch bedingten Infarkt zu erzeugen, wurde die Infarktauslösung mittels Herabsenkung des Blutdrucks in Anlehnung an SMITH et al. durchgeführt (SMITH et al., 1984).

Am narkotisierten, intubierten und kontrolliert beatmeten Tier wurden beidseits im Schenkelspalt die Aa. und Vv. femorales kanüliert. Dazu wurde am Innenschenkel die Haut und Unterhaut durchtrennt und die Gefäße dargestellt. Nach distaler Ligation (Seide; 1,5 metric; Serag Wiessner, Naila) und proximalem Abklemmen mittels Gefäßclip wurde das jeweilige Gefäß eröffnet und ein Katheter (Portex Polyethylene Tubing, ID 0,58 mm, Portex, Hythe, Kent, Großbritannien), gefüllt mit einer heparinisierten Ringer-Lösung (10 IE·ml<sup>-1</sup>; Liquemin<sup>®</sup>N25000, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen; Ringer-Infusionslösung Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), eingeführt. Nach Entfernen des Gefäßclips wurde der Katheter weiter ins Gefäß vorgeschoben und sein Sitz überprüft. Über die beiden Arterien erfolgten die kontinuierliche Blutdruckmessung und die Blutentnahme zur arteriellen Blutgasbestimmung sowie zur Auslösung der Hypotension. Über die Venen wurden das Muskelrelaxans (siehe 3.2.2.2) und der radioaktive Marker zur Messung des zerebralen Blutflusses (siehe 3.2.5) appliziert. Zur Induktion der Hypotension wurde dem Tier 0,2 ml Papaverinlösung (0,01 g·ml<sup>-1</sup>; Papaverinhydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Ringer-Infusionslösung Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) zur Vasodilatation injiziert und anschließend manuell mit heparinisierten (10 IE·ml<sup>-1</sup>) 2 ml-Spritzen Blut entzogen, bis der Blutdruck auf dem gewünschten Wert lag. Dieser Blutdruck wurde durch ständiges Entziehen und Re-transfundieren des Blutes für 15 oder 30 Minuten gehalten.

Vor Induktion der Hypotension (Normotension) und unmittelbar vor Experimentende (Hypotension) wurden Blutproben (0,2 ml) zur Analyse der Blutgase genommen (238 pH/blood gas analysator, Ciba Corning Diagnostics GmbH, Fernwald).

Zur Messung des ATP-Gehalts wurde das Tier anschließend sofort mittels *funnel-freezing* bei -80 °C eingefroren (siehe 3.2.2.6).

Bei Tieren, die zur autoradiographischen Messung des Blutflusses vorgesehen waren, erfolgte die Messung des Blutdrucks über die A. coccygea, da über eine Femoralarterie der Blutentzug zur Induktion der Hypotension erfolgte, während an der anderen Arterie Blutproben genommen wurden (siehe 3.2.5). Während der letzten Minute der fünfzehnminütigen Hypotension erfolgte die <sup>14</sup>C-Iodantipyrin-Infusion mit anschließender Tötung des Tieres durch Herzstillstand, ausgelöst durch intravenöse Injektion einer gesättigten KCl-Lösung (siehe 3.2.5).

### 3.2.2.6 Funnel-freezing

Um post mortem metabolische Veränderungen des Versuchstierhirns zu verhindern, wurden die Hirne mittels *funnel-freezing* eingefroren. Dazu wurden die Haut und Unterhaut am Schädel vom Augenbereich bis zum Hinterhaupt durchtrennt und das Gewebe bis auf den Knochen abgetragen. Durch einen Trichter aus Filterpapier (ecoLab-Faltenfilter Filtrak Qualitativ, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg), der auf den freipräparierten Knochen gesetzt wurde, wurde kontinuierlich für ca. fünf Minuten flüssiger Stickstoff gegeben (PONTEN et al., 1973). Die Beatmung des Tieres wurde während diesem Vorgang beibehalten. Dann wurde der Tubus entfernt und zunächst nur der Kopf, anschließend der ganze Körper des Tieres in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Aufbewahrung der Tiere bis zur Entnahme der Hirne erfolgte bei -80 °C.

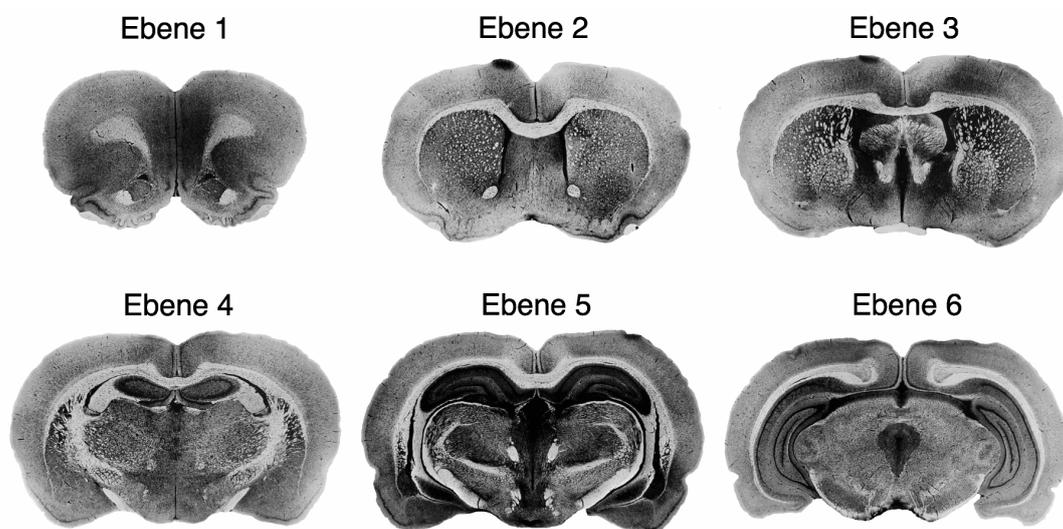
### 3.2.3 Histopathologische Aufarbeitung

#### 3.2.3.1 Hirnentnahme am tiefgefrorenem Tier

Um das Hirn aus dem bei -80 °C aufbewahrtem Tier zu entnehmen, erfolgte nach einer dreistündigen Adaptationszeit in der Coldbox (Thermo Kyl AB, Helsingborg, Schweden) bei -20 °C zunächst das Entfernen von Fell und Weichteilen am dorsalen und lateralem Schädelknochen mit dem Skalpell. Die Nasenspitze wurde in Höhe der Augen mit einer oszillierenden Säge (Proxxon Minimot 40/E, Proxxon GmbH, Niersbach) abgetrennt. Nach Abhebeln des Schädelknochens wurde das Hirn entnommen. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C.

#### 3.2.3.2 Schneiden der Hirne im Kryostaten

Die Hirne wurden nach einstündiger Adaptationszeit und Aufblocken mit Einbettmedium (Jung Einbettmedium, Leica instruments GmbH, Nussloch) im Kryostaten (Cryostat Leica Jung CM 3000, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim) bei -20 °C 20 µm dick geschnitten und auf Objektträger aufgezogen (Objektträger Menzel-Gläser®, G. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig). Die Schnitanzahl wurde gezählt, um so später den Abstand zwischen den einzelnen Ebenen berechnen zu können. Es wurden Schnitte in insgesamt sechs Ebenen abgenommen, die Strukturen im Gehirn (Kortex, N. caudatus putamen, Globus pallidus, Hippocampus, Hypothalamus) erfassen, wie in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5:** Schnittebenen der im Kryostat angefertigten Hirnschnitte  
Bilder von Hirnschnitten (modifiziert, nach KÖNIG, 1970)

#### 3.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

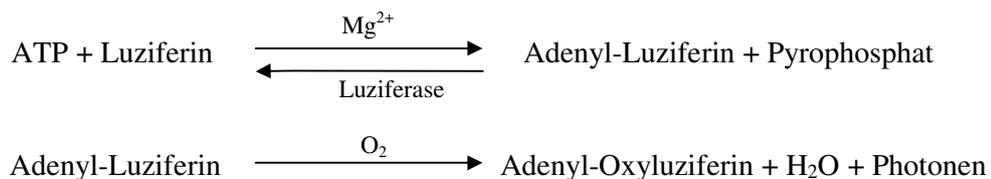
Mit den Hirnschnitten der Behandlungsserie wurden Hämatoxylin-Eosin (H.-E.) Färbungen durchgeführt, um histologische Schädigung der Neurone zu erkennen. Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen: Nachdem die Schnitte für sechs Minuten in

Hämalaun gefärbt wurden, wurde der überschüssige Farbstoff mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend die Schnitte zum Bläuen für fünf Minuten in Leitungswasser gegeben. Nach sechs Minuten in Eosinlösung (1 %) durchliefen die Schnitte neben Leitungswasser eine aufsteigende Ethanolreihe (70/96/100 %) sowie dreimalig Xylol Ersatz Medium (XEM) für je zwei Minuten. Abschließend werden die Schnitte mit einem Deckplättchen und DPX Einschlussmittel für die Histologie (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) eingedeckelt und getrocknet.

### 3.2.4 ATP-Messung

#### 3.2.4.1 ATP-Biolumineszenz

Bei der regionalen ATP-Messung handelt es sich um eine Biolumineszenzmethode (KOGURE und ALONSO, 1978; PASCHEN, 1990), bei der Luziferin unter Einwirkung des Enzyms Luziferase in Gegenwart von Sauerstoff und ATP zu Oxiluziferin oxidiert wird. Dabei entstehen Pyrophosphat, Adenosinmonophosphat und Energie, die in Form von Licht emittiert wird. Eine ähnliche Reaktion läuft bei Leuchtkäfern ab, bei denen Luziferase ein Bestandteil des Leuchtorgans ist.



Zur Vorbereitung wurden die Gefrierschnitte (20 µm) zunächst für zwei Stunden bei -20 °C in der Coldbox (Thermo Kyl AB, Helsingborg, Schweden) getrocknet und anschließend zur Denaturierung der ATP-verbrauchenden Enzyme für zehn Minuten in den Wärmeschrank (Inkubator Memmert, Memmert GmbH, Schwabach) bei 100 °C gelegt (PASCHEN, 1990). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte kurzzeitig bei -20 °C im Kryostaten (Cryostat Leica Jung CM 3000, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim) gelagert.

Die leicht angewärmten Hirnschnitte wurden mit 60 µm dicken Schnitten von einem vorgefertigten, gefrorenen ATP-Reaktionsgemischblock beschichtet und bis zur Aufnahme der Lumineszenz wieder bei -20 °C gefroren.

Zur Aufnahme wurde der Hirnschnitt in einer Dunkelkammer bei Raumtemperatur unter eine Digitalkamera (Digitalkamera SensiCam, PCO CCD Imaging, Kelheim) gelegt. Aufgrund der Erwärmung bei Raumtemperatur diffundiert das Reaktionsgemisch in den Gehirnschnitt und es kommt zur oben beschriebenen Reaktion. Die Lumineszenz ist abhängig von der jeweils vorhandenen ATP-Menge. Während einer Expositionszeit von 60 Sekunden wurde die abgegebene Lichtmenge von der Kamera registriert und digitalisiert (Bearbeitungssoftware SensiControl, PCO CCD Imaging, Kelheim). Die erhaltenen digitalisierten ATP-Verteilungsbilder wurden im Bildbearbeitungsprogramm (Bildbearbeitungssystem NIH Image 155/P, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) bearbeitet.

In dem ATP-Reaktionsgemisch sind die erforderlichen Enzyme und Faktoren für die Biolumineszenzreaktion vorhanden. Zur Herstellung wurden 100 mg Glycerin, 200 mg Gelatine, 100 mg Polyvinylpyrrolidone und 10 ml Hepes-Arsenat-Puffer unter Rühren für etwa zehn Minuten bei 50 °C gelöst. Pulverisierte Leuchtkäferschwänze des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (220 mg; Desicated firefly tails, Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Steinheim) wurden in die handwarme (30 °C) Gelatinemischung gegeben, im Ultra-Turax® (Janke & Kunkel KG, Staufen i.Brsg.) gemischt und zentrifugiert (2 min; 13000·g; Biofuge pico, Heraeus Instruments, Düsseldorf). Der Überstand wurde mit 20 µl MgCl<sub>2</sub> gemischt und in die vorgekühlten Förmchen gegeben. Nach Abkühlung der Lösung im Kühlschrank wurden die Blöcke bei -70 °C in 2-Methylbutan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Hepes-Arsenat-Puffer

0,2 M Hepes; 0,1 M Natrium-Arsenat; pH = 7,6

### **3.2.4.1 Fluorometrische Bestimmung des ATP-Gehalts**

Um an den erhaltenden ATP-Bilder eine Aussage über den regionalen ATP-Gehalt machen zu können, erfolgte eine fluorometrischen Bestimmung des ATP-Gehalts in den Hemisphären des nach dem Schneiden verbleibenden Hirns, um eine Kalibrierung der ATP-Bilder vornehmen zu können.

In der Coldbox (-20 °C, Thermo Kyl AB, Helsingborg, Schweden) wurde aus jeder Hemisphäre je ein Gewebestück von 4 - 20 g entnommen, gewogen und in einem Eppendorfggefäß mit 20 µl 0,1 M HCl in Methanol (4 °C) versetzt. Nach 20 - 30 Minuten wurden die Proben mit einem Glasstab gut gemischt, mit 50 µl 0,6 M HClO<sub>4</sub> + 1 mM EGTA (4 °C) versehen und sofort mit dem Ultraschallstab (Sonifier® B-12, Brausen Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) homogenisiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben zentrifugiert (4 °C, 10.000·g, 4 min, Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg). 50 µl des Überstands wurden in ein leeres Eppendorfggefäß überführt. Das Pellet wurde mit 50 µl 0,6 M HClO<sub>4</sub> + 1 mM EGTA versetzt, homogenisiert und nach 15 Minuten Inkubation zentrifugiert (4 °C, 10.000·g, 4 min, Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde abpipettiert, das genaue Volumen dabei notiert und in das Eppendorfggefäß gegeben. Die auf Eis gelagerten Überstände werden mit 3 M KOH + 0,5 M KCl neutralisiert. Dabei wurde das zugegebene Volumen notiert. Gegebenenfalls wurde mit 0,6 M HClO<sub>4</sub> + 1 mM EGTA gegenpipettiert. Der Überstand wurde zur Trennung des ausgefallenen Perchlorat abzentrifugiert (4 °C, 10.000·g, 4 min, Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg), abgenommen und in ein Eppendorfggefäß überführt. Die Lagerung der Überstände und der Pellets erfolgte bei -80 °C.

Zur Erstellung der Eichkurve für die fluorometrische Messung der ATP-Konzentration werden vier ATP-Standards (0,5 M; 0,25 M; 0,125 M; 0,065 M) und Wasser als Nullwert gemessen. Je 10 µl wurden in einer Einmalküvette mit 1 ml Testmix versehen. Nach 10 Minuten wurden 10 µl Hexokinase-Lösung zugegeben. Nach weiteren 20 Minuten erfolgte die Messung im Fluoreszenzspektrophotometer (Fluoreszenz Spectrophotometer F2000, Hitachi Ltd., Tokio, Japan).

Zur Messung der Proben wurden die Überstände über Eis aufgetaut. Je 10 µl der Proben wurden nach dem oben beschriebenen Vorgehen gemessen. Die erhaltenen Werte gaben die ATP-Konzentration in mMol·kg<sup>-1</sup> wieder. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor erhielt man die Werte in µMol·g<sup>-1</sup> bezogen auf das entnommene Gewebe. Im Bildbearbeitungsprogramm (Bildbearbeitungssystem NIH Image 155B5, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) wurde auf den ATP-Bildern der Ebene 6 im Bereich der Entnahmestelle der Proben die optische Dichte gemessen und diese der ATP-Konzentration in µMol·g<sup>-1</sup> gleichgestellt. Da von jedem Hirn zwei Proben entnommen wurden, konnte für jedes Hirn eine Eichkurve erstellt werden, so dass die Korrelation zwischen optischer Dichte und ATP-Konzentration auf die ATP-Bilder der anderen Ebenen übertragen werden konnte.

Die Durchführung der fluorometrischen ATP-Bestimmung wurde von Frau M. Jagodnik übernommen.

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (verdünnt)  
600 µl Glc-6-PDH (1mg·ml<sup>-1</sup>); 2,4 ml BSA + Tris-Puffer

BSA + Tris-Puffer  
1,8 mg BSA; 9 ml Aqua dest.; 1 ml Tris-Puffer

Hexokinase-Lösung  
10 µl Hexokinase; 500 µl BSA + Tris-Puffer

Testmix  
90 ml Tris-Puffer (0,1M; pH 7,5)  
6 ml MgCl<sub>2</sub>  
200 µl Glukose (0,5M)  
600 µl DTT (0,015 g·ml<sup>-1</sup>)  
800 µl NADP (0,005 g·ml<sup>-1</sup>)  
2 ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (verdünnt)

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{0,8 \cdot A + (B + C)}{A} \cdot \frac{(D + E)}{D}$$

A: Gewicht der entnommenen Hirnprobe (mg)

B: 0,1 M HCl in Methanol (µl)

C: 0,6 M HClO<sub>4</sub> + 1 mM EGTA (µl)

D: abgenommener Überstand

E: Neutralisationslösung (µl; 0,6 M HClO<sub>4</sub> + 1 mM EGTA bzw. 3 N KOH + 0,5 M KCl)

### 3.2.5 Autoradiographische Messung der regionalen Hirndurchblutung

Die Messung der regionalen Hirndurchblutung erfolgte mittels <sup>14</sup>C-Iodoantipyrin-Autoradiographie (SAKURADA, et al. 1978). Jodantipyrin (IAP) ist frei diffusibel, biologisch inert und reichert sich in Abhängigkeit von der Durchblutung in einem Organ an.

Unmittelbar vor Experimentende wurde den Versuchstieren mittels einer Infusionspumpe (Infusionspumpe Precidor, Infors AG, Basel, Schweiz) <sup>14</sup>C-IAP (American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA; 40 µCi pro Tier; Injektionsvolumen 1 ml) intravenös über die Dauer von einer Minute appliziert. Sowohl vor als auch während der Applikation wurden arterielle Blutproben genommen (alle 7 - 10 Sekunden), indem zwei bis drei Blutropfen im Abstand von zehn Sekunden auf vorgewogenem Filterpapier aufgefangen wurden. Zwischen den einzelnen Blutproben wurden ein bis zwei Blutropfen verworfen. In der sechzigsten Sekunde wurde das Tier durch intravenöse Kaliumchloridinjektion (Kaliumchlorid 7,45 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) getötet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach der Entnahme der Hirne (siehe 3.2.3.1) wurden diese im Kryostaten geschnitten (siehe 3.2.3.2), auf den Objektträger aufgezogen und sofort zum Trocknen auf eine 40 °C warme Heißplatte gelegt, um ein Diffundieren des IAP zu verhindern. Die Hirnschnitte wurden zehn Tage einem speziellem <sup>14</sup>C-sensitivem Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>-βmax, Amersham International plc., Buckinghamshire, Großbritannien) exponiert und abschließend konventionell entwickelt. In Folge der durch radioaktiven Zerfall entstehenden Strahlung

kommt es zur regionalen Filmschwärzung. Nach Einscannen der gewonnenen Autoradiogramme sowie der mitexponierten  $^{14}\text{C}$ -Standards (Amersham Bioscience UK Limited, Buckinghamshire, Großbritannien) mittels Digitalkamera (Sony<sup>®</sup> CCD Schwarz Weiß Videokamera, Modell SSC-M370CE, Sony Corporation, Japan; Durchleuchtschirm Northern Light Precision Illuminator, Modell B90, Imaging Research Inc., Kanada) wurde über die Messung der optischen Dichte die Gewebekonzentration an  $^{14}\text{C}$ -Iodoantipyrin berechnet (Bildbearbeitungssystem NIH Image 155ß5, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA).

Die Filterpapiere mit den gewonnenen Blutproben wurden sofort nach der Entnahme erneut gewogen und aus der Differenz zum Gewicht vor Probennahme das Gewicht der jeweiligen Blutprobe berechnet. Zusammen mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Econofluor<sup>TM</sup>-2, NEN Research Products, Boston, MA, USA) wurden die Filterpapiere in Röhrchen gegeben, gemischt und die Radioaktivität im Szintillationszähler (Flüssigszintillationszähler Typ Wallac 1410, Wallac Distribution GmbH, Freiburg i. Brsg.) gemessen.

Im Bildanalyseprogramm (Bildbearbeitungssysteme NIH Image 155ß5, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA) wurde für jedes Tier über die gemessene Radioaktivität der Blutproben und die Gewebekonzentration an  $^{14}\text{C}$ -Iodoantipyrin die lokale Durchblutungsrate ( $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) in den einzelnen Regionen der autoradiographischen Hirnschnitte kalkuliert.

### 3.3 Datenverarbeitung und Auswertung

#### 3.3.1 Ausschlusskriterien

Während der 3-VO starben in der Etablierungsstudie insgesamt sieben Tiere. Eines starb in Folge einer Papavarinüberdosis.

In der Behandlungsstudie starben neun Tiere während der 3-VO, zwei während der einwöchigen Überlebenszeit und zwei weitere während der Durchführung der Hypotension. In fünf Fällen war eine Infarktauswertung aufgrund von technischen Schwierigkeiten nicht möglich, und fünf Tiere wurden wegen starkem Gewichtsverlust (> 10 %) ausgeschlossen.

<u>Versuchsreihe</u>	<u>Gruppenbezeichnung</u>	<u>Eingesetzte Tiere</u>	<u>Ausgewertete Tiere</u>
Etablierungsstudie	1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg	9	5
	7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	7	7
	7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	4	3
	7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	4	3
	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	4	3
	7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	4	3
Behandlungsstudie	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	22	11
	7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	20	14
	Kontrolle	4	4
	1 h 3-VO	4	4
	7 d 3-VO / GM-CSF	8	4
	7 d 3-VO / Ringer	6	4

### **3.3.2 Auswertung der ATP-Messungen**

#### ***3.3.2.1 Bestimmung des Infarktvolumens***

Die Bestimmung des Infarktvolumens erfolgte anhand des ATP-Gehaltes semiquantitativ in Anlehnung an Swanson (SWANSON et al., 1990). Ipsi- (auf der Seite der verschlossenen A. carotis) und kontralateral (auf der Seite der offenen A. carotis) wurden im Bildbearbeitungsprogramm (NIH Image Software 1.55/P, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) in den digitalisierten Aufnahmen der ATP-Biolumineszenzen der Hirnschnitte die Areale gemessen, in denen der ATP-Gehalt bei  $\geq 0,5 \mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$  lag. Durch Abzug der gemessenen ipsilateralen Areale vom intakten kontralateralen Hirnareal konnte die Infarktfläche in den einzelnen Ebenen berechnet werden. Da beim Schneiden der Hirne die Anzahl der verworfenen Schnitte zwischen den einzelnen Ebenen festgehalten wurde, konnte daraus der Abstand zwischen den einzelnen Ebenen ermittelt werden. Aus Hirn- bzw. Infarktfläche und dem Abstand zwischen den einzelnen Ebenen konnte das Hirn- und Infarktvolumen bestimmt werden. Das Infarktvolumen wurde absolut ( $\text{mm}^3$ ) als auch in Relation zum Volumen der kontralateralen Hemisphäre (% kontralat. Vol.) angegeben. Da aufgrund der kurzen Dauer der durchgeführten Hypotension keine zelluläre Wasserverschiebung zu erwarten war, wurde keine Ödemkorrektur vorgenommen.

#### ***3.3.2.2 Regionale ATP-Verluste***

Um regionale ATP-Verluste quantifizieren zu können, wurden im Bildbearbeitungsprogramm (NIH Image Software 1.55/P, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) die entsprechenden Hirnbereiche umfahren und dann aus Fläche und ATP-Konzentration der durchschnittliche ATP-Gehalt dieses Bereiches kalkuliert. Die ermittelten ipsilateralen Werte wurden ins Verhältnis zu den ermittelten kontralateralen Werten gesetzt und als Prozent des kontralateralen ATP-Gehaltes angegeben.

### **3.3.3 Auswertung der CBF-Messungen**

#### ***3.3.3.1 Regionale CBF-Messungen***

Um regionale Unterschiede im zerebralen Blutfluss quantifizieren zu können, wurden im Bildbearbeitungsprogramm (NIH Image Software 1.55/P, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) die unterschiedlichen Hirnbereiche umfahren und der dortige Blutfluss kalkuliert. Die ermittelten ipsilateralen Werte wurden ins Verhältnis zu den ermittelten kontralateralen Werten gesetzt und als Prozent des kontralateralen ATP-Gehaltes angegeben.

### **3.3.4 Schematische Darstellung der Infarkthäufigkeit**

Zur besseren Veranschaulichung der Verteilung der Infarkthäufigkeit wurde anhand der digitalisierten Aufnahmen der ATP-Biolumineszenzen der Hirnschnitte eines jeden einzelnen Tieres der regionale ATP-Verlust auf Höhe des Striatums in eine Vorlage eingezeichnet und diese Vorlagen übereinander gelegt. Mittels eines Bildbearbeitungsprogramms (NIH Image Software 1.55/P, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) wurde die Inzidenz für den ATP-Verlust pixelweise kalkuliert und als Prozentanteil der Gruppengröße dargestellt.

### 3.3.5 Statistische Auswertung

Die gemessenen Werte wurden auf einem Personalcomputer im Datenverarbeitungsprogramm Microsoft<sup>®</sup> Excel 2002 (Microsoft Corporations) sowie im Statistikprogramm WinStat<sup>®</sup>, Version 3.1 (Microsoft Corporations) erfasst und verarbeitet.

Mit dem abhängigen Students t-Test wurden Unterschiede innerhalb einer Gruppe (Blutparameter unter Normo- und Hypotension; regionale ATP-Verluste) untersucht.

Gruppenunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen (Vergleich der verschiedenen Hypotensionsstufen in der Etablierungsstudie; Vergleich der mit GM-CSF und Ringerlösung behandelten Tieren in der Behandlungsstudie) wurden mit dem Mann-Whitneys U-Test für unabhängige Stichproben ermittelt.

Für alle statistischen Tests wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit P zweiseitig bei 5 % festgelegt. Ein Testergebnis mit  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

Die gemessenen Parameter sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) angegeben.

## 3.4 Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien

### 3.4.1 Laborausstattung

238 pH/blood gas analysator	Ciba Corning Diagnostics GmbH, Fernwald
Bearbeitungssoftware PeriSoft	PeriMed, Järfalla, Schweden
Bearbeitungssoftware SensiControl	PCO CCD Imaging, Kelheim
Bildbearbeitungssysteme NIH Image 155/P und 155ß5	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA
Coldbox	Thermo Kyl AB, Helsingborg, Schweden
Cryostat Leica Jung CM 3000	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Digitalkamera SensiCam	PCO CCD Imaging, Kelheim
Durchleuchtschirm Northern Light Precision Illuminator, Modell B90	Imaging Research Inc., Kanada
Erbotom ICC 50	Erbe Elektromedizinbedarf GmbH, Tübingen
Fluoreszenz Spectrophotometer F2000	Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan
Flüssigszintillationszähler Typ Wallac 1410	Wallac Distribution GmbH, Freiburg i. Brsg.
Halothan-Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck
Infusionspumpe Precidor	Infors AG, Basel, Schweiz
Inkubator Memmert	Memmert GmbH, Schwabach
Kleintierrespirator	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Koagulationssonde (Durchmesser 0,45 mm)	Erbe Elektromedizinbedarf GmbH, Tübingen
mikrochirurgische Instrumente	Aesculap, Tuttlingen
Operationsmikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Oxydig	Drägerwerk AG, Lübeck
PeriFlux System 5000	PeriMed, Järfalla, Schweden
Proxxon Minimot 40/E	Proxxon GmbH, Niersbach
Sony <sup>®</sup> CCD Schwarz Weiß Videokamera, Modell SSC-M370CE	Sony Corporation, Japan
Stereotaktisches Gerät	
Ultraschallstab Sonifier <sup>®</sup> B-12	Brausen Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
Ultra-Turax <sup>®</sup>	Janke & Kunkel KG, Staufen i.Brsg.
Varimag <sup>®</sup> Electronicrührer	H + P Labortechnik, München

Vortex Genie 2™  
Zentrifuge 5417C  
Zentrifuge Biofuge pico

Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz  
Eppendorf, Hamburg  
Heraeus Instruments, Düsseldorf

### 3.4.2 Laborchemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig  
Bayer Vital GmbH, Fernwald  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Merck Eurolab GmbH, Lohmar  
Roche Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim  
Serva Feinbiochemica, Heidelberg  
Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
VWR International, Langenfeld

### 3.4.3 Radiochemikalien

4-[n-methyl-<sup>14</sup>C]-Iodantipyrin  
spezifische Aktivität 55 mCi·mmol<sup>-1</sup>  
radioaktive Konzentration 0,1 mCi·ml<sup>-1</sup>  
Autoradiographie-Standard <sup>14</sup>C

American Radiolabeled Chemicals Inc., St.  
Louis, MO, USA

Amersham Bioscience UK Limited,  
Buckinghamshire, Großbritannien

### 3.4.4 Medikamente

Aqua ad iniectabilia Braun  
Bupivacain-RPR® 0,5%  
Halothan Eurim  
Kaliumchlorid 7,45 %  
Leucomax 300  
Leukine®  
Liquemin® N25000  
Pancuronium 'Organon'®  
  
Papaverinhydrochlorid  
Ringer-Infusionslösung Braun

B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
A. Nattermann & Cie. GmbH, Köln  
Eurim-Pharm, Piding  
B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
Schering-Plough (Brinny) Co., Irland  
Immunex Corporation, Seattle, USA  
Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen  
Organon Teknika Medizinische Produkte  
GmbH, Eppelheim  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
B. Braun Melsungen AG, Melsungen

### 3.4.5 Verbrauchsmaterialien

Agfa Agefix, B&W Fixer  
Desicated firefly tails  
DPX Einschlussmittel für die Histologie  
ecoLab-Faltenfilter Filtrak Qualitativ (ø  
240mm)  
Econofluor™-2

Agfa-Gevaert AG, Leverkusen  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs  
GmbH, Heidelberg  
NEN Research Products, Boston, MA, USA

Hyperfilm™-βmax	Amersham International plc., Buckinghamshire, Großbritannien
Ilford Phenisol Entwickler	Ilford Imaging UK Limited, Mobberley, Cheshire, Großbritannien
Jung Einbettmedium	Leica instruments GmbH, Nussloch
Kodak Scientific Imaging Film	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biomax™MMS	
Objektträger Menzel-Gläser®	G. Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Portex Polyethylene Tubing, ID 0,58/0,75/2,0 mm	Portex, Hythe, Kent, Großbritannien
Seide; 1,5 und 1 metric	Serag Wiessner, Naila

Die in dieser Arbeit verwendeten Plastikeinmalartikel wurden von folgenden Firmen bezogen:

- B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Eppendorf, Hamburg
- Falcon, Heidelberg; GLW, Würzburg
- Greiner Labortechnik GmbH, Solingen
- Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
- Sarstedt, Nümbrecht
- Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien