

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierungsstudie

Ziel der Etablierungsstudie war, ein neues Tiermodell eines hämodynamischen Schlaganfalls auf Basis einer persistierenden Hypoperfusion des Hirns zu entwickeln. Dazu wurden bei Tieren unmittelbar oder eine Woche nach Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO) der Blutdruck durch hämorrhagische Hypotension auf 50 - 20 mmHg gesenkt und für 15 oder 30 Minuten auf diesem Niveau gehalten. Folgende Gruppen wurden untersucht:

- 1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg
- 7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg
- 7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg
- 7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg
- 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg
- 7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg

#### 4.1.1 Drei-Gefäß-Okklusion

Die 3-VO wurde wie bei BUSCH et al. beschrieben durchgeführt (BUSCH et al., 2003). Die Tiere der chronischen Versuche, die eine Woche nach der Drei-Gefäß-Okklusion überlebten, erlitten in dieser Zeit einen Gewichtsverlust von  $0,9 \pm 2,9$  % bis  $4,6 \pm 1,0$  % (vgl. Tab.1). Der durchschnittlichen Gewichtsverlust lag bei  $2,7 \pm 3,6$  %, was den Literaturangaben entspricht (BUSCH et al., 2003).

Während der Durchführung der 3-VO wurde der ipsilaterale Blutfluss, also auf Seiten der ligierten A. carotis mittels Laser-Doppler gemessen. Der ipsilaterale LDF-Abfall in den einzelnen Gruppen lag bei  $47,0 \pm 16,1$  % bis  $57,4 \pm 14,0$  % (vgl. Tab. 1). Der durchschnittliche LDF-Abfall nach 3-VO betrug  $51,6 \pm 11,9$  % und somit ebenfalls in dem in der Literatur angegebenen Bereich (BUSCH et al., 2003).

Es bestanden keine Unterschiede hinsichtlich dieser zwei Parameter zwischen den einzelnen Gruppen.

Gruppe	Gewichtsverlust [%] nach 7d 3-VO	LDF ipsi [%] nach 3-VO
1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg	—	$57,4 \pm 14,0$
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	$0,9 \pm 2,9$	$47,4 \pm 4,4$
7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	$3,6 \pm 2,2$	$47,0 \pm 16,1$
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	$4,6 \pm 1,0$	$49,7 \pm 15,0$
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	$3,6 \pm 3,8$	$52,7 \pm 18,3$
7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	$3,1 \pm 7,1$	$57,0 \pm 11,4$

**Tab. 1:** Gewichtsverlust innerhalb einer Woche sowie ipsilateraler Blutflussabfall (LDF ipsi) unmittelbar nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3 - 7 Tiere pro Versuchsgruppe).

#### 4.1.2 Einfluss der spontanen Arteriogenese

Um den Einfluss der natürlich einsetzenden Arteriogenese auf eine Hypotension von 50 mmHg zu untersuchen, wurden zwei Tiergruppen untersucht. In einer Gruppe wurden 3-VO und Hypotension am selben Tag durchgeführt (1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg), während bei einer anderen Gruppe eine Woche dazwischen lag (7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg).

#### 4.1.2.1 Einfluss der Hypotension auf die Blutparameter

Bei einer lokalen zerebralen Durchblutungsstörung wie bei einem Schlaganfall oder einer Hypotension kann es in Folge der lokalen Durchblutungsstörung und dem damit verbundenen gestörtem Abtransport von Stoffwechselprodukten zu einer metabolischen Azidose, die sich in den gemessenen Blutparametern widerspiegeln kann.

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck lag sowohl vor als auch nach der Hypotension bei beiden Gruppen im Normalbereich (vgl. Tab. 2).

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck fiel in beiden Gruppen von  $34,4 \pm 14,0$  mmHg bzw.  $43,6 \pm 3,5$  mmHg auf  $23,3 \pm 13,6$  mmHg bzw.  $26,7 \pm 4,9$  mmHg ab ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,005$ ; vgl. Tab. 2).

Der arterielle pH fiel in beiden Gruppen von  $7,42 \pm 0,08$  bzw.  $7,37 \pm 0,03$  auf  $7,30 \pm 0,21$  bzw.  $7,30 \pm 0,10$  (vgl. Tab. 2).

Basalwerte unter Normotension	Blutdruck [mmHg]	PaO <sub>2</sub> [mmHg]	PaCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg	$112,0 \pm 21,7$	$161,6 \pm 39,3$	$34,4 \pm 14,0$	$7,42 \pm 0,08$
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	$112,1 \pm 12,2$	$147,7 \pm 33,5$	$43,6 \pm 3,5$	$7,37 \pm 0,03$
Hypotension				
1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg	$50,1 \pm 2,3$	$148,5 \pm 27,2$	$23,3 \pm 13,6^*$	$7,30 \pm 0,21$
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	$49,0 \pm 1,2$	$155,3 \pm 41,6$	$26,7 \pm 4,9^\bullet$	$7,30 \pm 0,10$

**Tab. 2:** Auswirkung einer fünfzehnminütigen Hypotension von 50 mmHg auf die arteriellen Blutparameter Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO<sub>2</sub>) und pH unmittelbar sowie eine Woche nach 3-VO

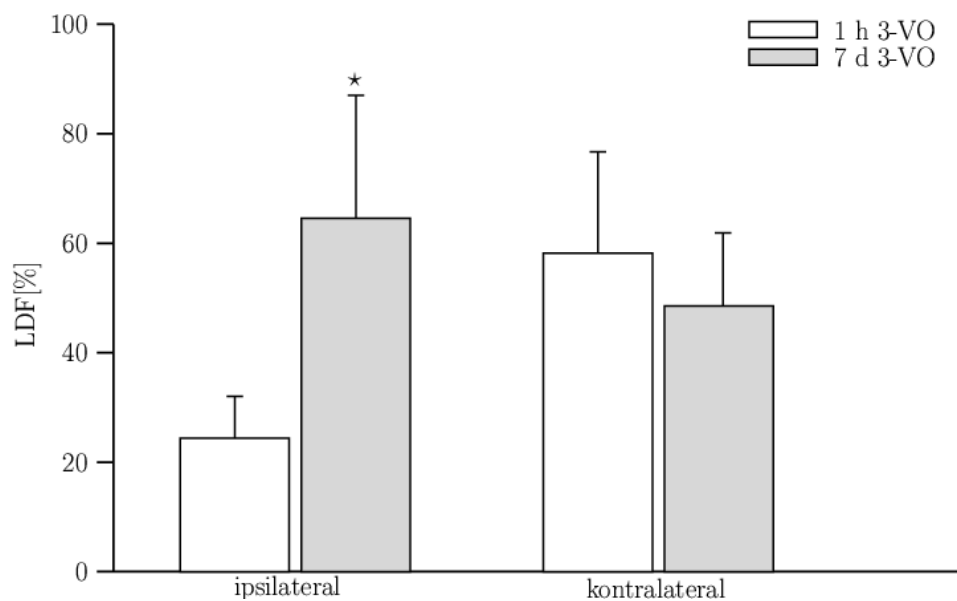
Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 5 - 7$  Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test zu den Werten unter Normotension sind mit \* für  $p < 0,05$  und  $\bullet$  für  $p < 0,005$  gekennzeichnet.

#### 4.1.2.2 Messwerte während der Hypotension

Der Blutdruck lag in den beiden zu vergleichenden Gruppen bei  $112,0 \pm 21,7$  mmHg bzw.  $112,1 \pm 12,2$  mmHg vor, und bei  $50,1 \pm 2,3$  mmHg bzw.  $49,0 \pm 1,2$  mmHg während der Hypotension. Die prozentuale Blutdruckabsenkung lag bei  $46,0 \pm 10,2$  % bzw.  $44,9 \pm 5,5$  %.

Während der Hypotension wurde der Blutfluss kontinuierlich mittels LDF-Messung aufgezeichnet, so dass der prozentuale Flussabfall berechnet werden konnte.

Da bei der Gruppe 1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg die 3-VO und die Hypotension am selben Tag durchgeführt wurden, ist der ipsilaterale Flussabfall, also auf der Seite der ligierten A. carotis, während der Hypotension deutlich stärker als bei der Gruppe, die nach der 3-VO eine Woche überlebte und dann erst im Infarktmodell untersucht wurde (7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg). So steht ein Abfall auf  $24,4 \pm 7,6$  % im akuten einem Abfall auf  $64,6 \pm 22,5$  % im chronischen Versuch gegenüber ( $p < 0,005$ ). Der LDF-Abfall auf der kontralateralen Seite, also auf der Seite mit der offenen A. carotis, liegt dagegen bei beiden Gruppen im gleichen Bereich (1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg:  $58,2 \pm 18,5$  %; 7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg:  $48,6 \pm 13,3$  %; vgl. Abb. 6).



**Abb. 6:** Auswirkung einer fünfzehnminütigen Hypotension von 50 mmHg auf den ipsi- und kontralateralen LDF-Abfall unmittelbar sowie eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 5 - 7$  Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitneys U-Test zwischen den Gruppen sind mit \* für  $p < 0,005$  gekennzeichnet.

#### 4.1.2.3 Regionale ATP-Messung

In Anlehnung an die Literaturangaben für Schlaganfallmodelle mit Blutdrucksenkung bei gleichzeitigem Gefäßverschluss (SMITH et al., 1984) wurden in einer Gruppe (1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg;  $n = 5$ ), bei der die 3-VO und die Hypotension am selben Tag durchgeführt wurden, ein Blutdruckniveau von 50 mmHg gewählt. 60 % der Tiere zeigten lokale ipsilaterale ATP-Verluste, was auf eine lokale Durchblutungsstörung im Gehirn hinweist (vgl. Abb. 7). Da in dieser Gruppe keine fluorometrische ATP-Messung und somit keine ATP-Kalibrierung der gewonnenen ATP-Bilder durchgeführt wurden, sind keine Angaben zum Infarkt volumen möglich.



**Abb. 7:** Ipsilaterales ATP-Defizit nach 3-VO und fünfzehnminütiger Hypotension von 50 mmHg am selben Tag

Originalbild einer ATP-Biolumineszenz, Ebene 2; ATP-abhängige Biolumineszenz wird durch die dunkel gefärbten Regionen dargestellt.

In der anderen Gruppe (7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg; n = 7), bei der nach der 3-VO bis zur Auslösung der Hypotension eine Woche gewartet wurde, war bei keinem der Tiere ein ATP-Defizit zu verzeichnen.

#### 4.1.3 Vergleich einer fünfzehnminütigen Hypotension von 50 bis 20 mmHg

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse wurden in diesem Versuchsabschnitt vier Gruppen verglichen, bei denen eine fünfzehnminütige, jeweils unterschiedlich tiefe Hypotension eine Woche nach 3-VO durchgeführt wurde, um den Schwellenwert zum Auftreten ipsilateraler ATP-Defizite nach physiologisch einsetzender Arteriogenese zu ermitteln.

##### 4.1.3.1 Einfluss der Hypotensionstiefe auf die Blutparameter

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck lag vor sowie nach der Hypotension bei allen vier Gruppen im Normalbereich (vgl. Tab. 3).

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck fiel in den einzelnen Gruppen signifikant von durchschnittlich  $41,9 \pm 3,6$  mmHg auf  $25,3 \pm 5,7$  mmHg ab ( $p < 0,05$ ; vgl. Tab. 3).

Der arterielle pH fiel ebenfalls ab, von Werten um  $7,39 \pm 0,06$  auf  $7,30 \pm 0,14$ , wobei dieser Abfall nur bei einer Hypotension von 50 mmHg signifikant war ( $p < 0,05$ ; vgl. Tab. 3).

Basalwerte unter Normotension	Blutdruck [mmHg]	PaO <sub>2</sub> [mmHg]	PaCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	$112,1 \pm 12,2$	$147,7 \pm 33,5$	$43,6 \pm 3,5$	$7,37 \pm 0,03$
7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	$100,0 \pm 13,2$	$144,7 \pm 16,6$	$42,7 \pm 3,2$	$7,37 \pm 0,02$
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	$120,0 \pm 8,7$	$119,0 \pm 5,6$	$37,3 \pm 2,9$	$7,40 \pm 0,02$
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	$110,0 \pm 17,3$	$143,7 \pm 41,5$	$42,0 \pm 1,0$	$7,44 \pm 0,04$
Hypotension				
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	$49,0 \pm 1,2$	$155,3 \pm 41,6$	$26,7 \pm 4,9^\bullet$	$7,30 \pm 0,10^*$
7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	$39,2 \pm 0,5$	$139,0 \pm 22,6$	$31,3 \pm 1,2^*$	$7,36 \pm 0,03$
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	$29,2 \pm 0,7$	$107,0 \pm 19,2$	$22,3 \pm 3,2^*$	$7,32 \pm 0,02$
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	$18,9 \pm 0,3$	$110,3 \pm 35,9$	$19,0 \pm 4,6^*$	$7,29 \pm 0,08$

**Tab. 3:** Auswirkung einer fünfzehnminütigen Hypotension von 50 - 20 mmHg auf die arteriellen Blutparameter Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO<sub>2</sub>) und pH eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3 - 7 Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test zu den Werten unter Normotension sind mit \* für  $p < 0,05$  und  $\bullet$  für  $p < 0,005$  gekennzeichnet.

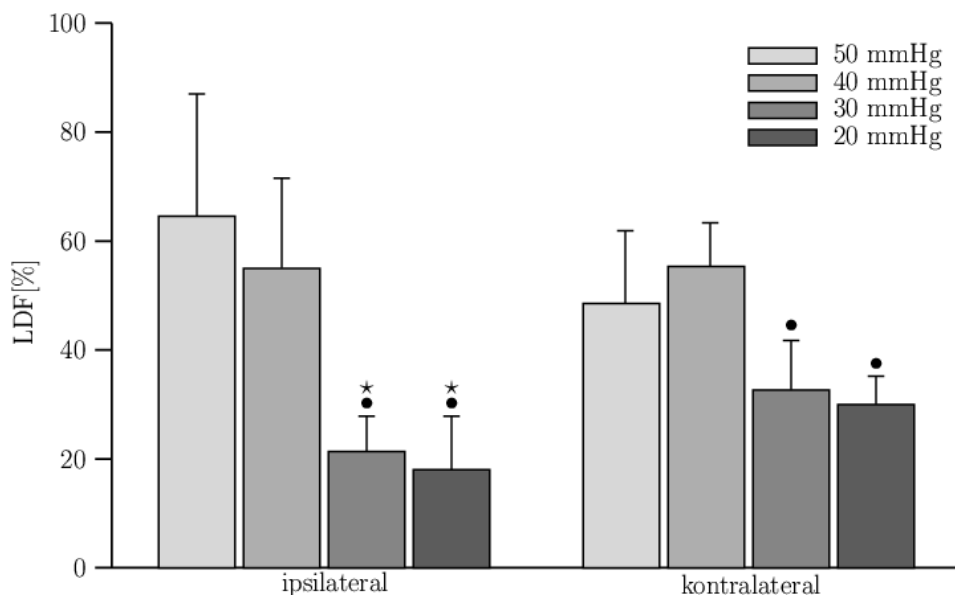
##### 4.1.3.2 Messwerte während der Hypotension

In den einzelnen Gruppen lag der Ausgangsblutdruck in einem Bereich von 100 - 120 mmHg, der dann auf 50, 40, 30 oder 20 mmHg gesenkt und auf diesem Niveau für 15 Minuten gehalten wurde (vgl. Tab. 3).

Abhängig vom Hypotensionsniveau waren die Abfälle der gemessenen LDFs unterschiedlich (vgl. Abb. 8). Je tiefer der Blutdruck während der fünfzehnminütigen Hypotension war, desto niedriger waren auch die Werte des ipsilateralen LDF (vgl. Abb. 8). Dabei lag während einer

Hypotension von 50 und 40 mmHg die gemessene Absenkung des LDF bei  $64,6 \pm 22,5 \%$  bzw.  $55,0 \pm 6,5 \%$ . Bei einer tieferen Hypotension lag er bei  $21,3 \pm 6,5 \%$  (30 mmHg) bzw.  $18,0 \pm 9,9 \%$  (20 mmHg).

Im Gegensatz dazu scheint kein Zusammenhang zwischen kontralateralem LDF-Abfall und erreichtem Blutdruck vorzuliegen (vgl. Abb. 8). Der LDF-Abfall liegt bei höheren Blutdruckwerten bei Werten um 50 % (50 mmHg:  $48,6 \pm 13,3 \%$ ; 40 mmHg:  $55,3 \pm 8,0 \%$ ), bei einem niedrigeren Blutdruck bei Werten um 30 % (30 mmHg:  $32,7 \pm 9,1 \%$ ; 20 mmHg:  $30,0 \pm 5,2 \%$ ).

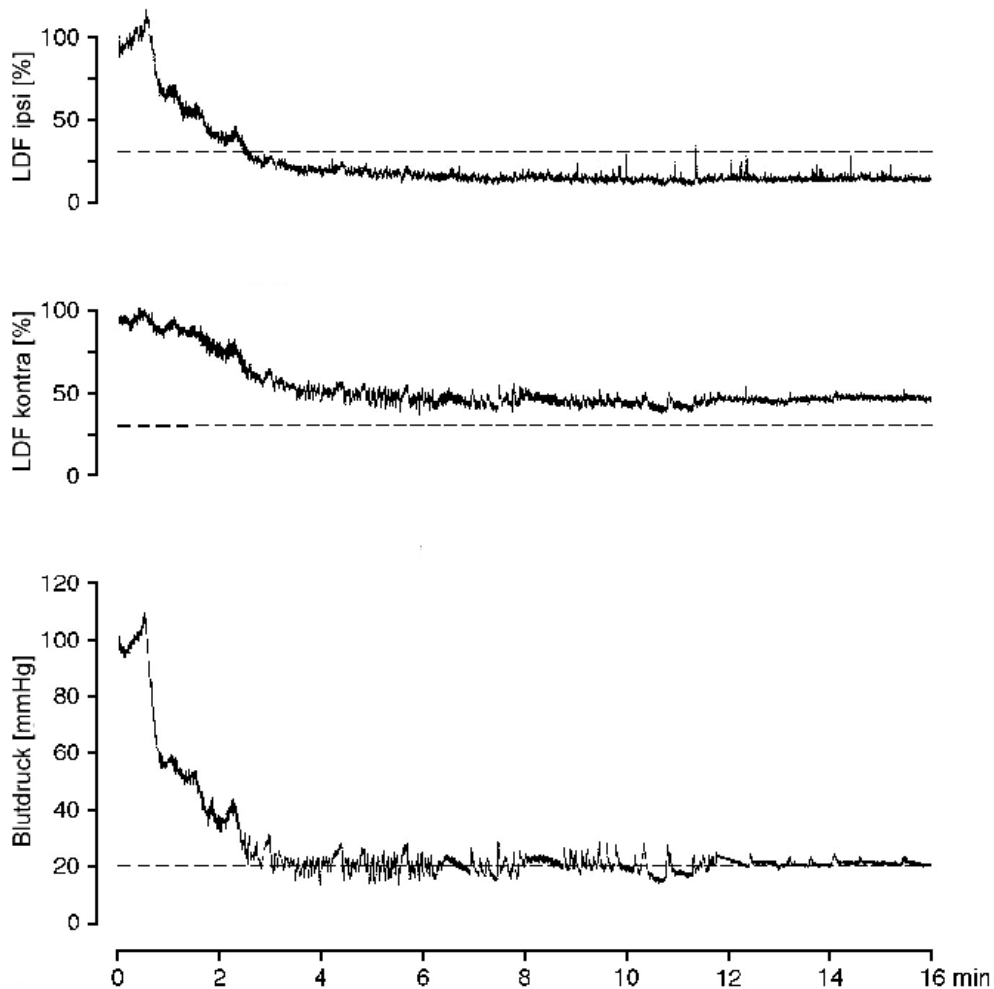


**Abb. 8:** Ipsi- und kontralateraler LDF-Abfall nach fünfzehnminütiger Hypotension von 50 bis 20 mmHg eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3 - 7$  Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitneys U-Test zur 50 mmHg Hypotension sind mit \* für  $p < 0,05$ ; zur 40 mmHg Hypotension mit • für  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass bei einer Hypotension von 50 und 40 mmHg der LDF-Abfall auf beiden Seiten annähernd gleich war, während bei 30 und 20 mmHg der ipsilaterale LDF-Abfall deutlich stärker ausfiel (vgl. Abb. 8).

In Abb. 9 ist exemplarisch die Aufzeichnung des Blutdrucks sowie des mittels Laser-Doppler gemessenen Blutflusses während einer Hypotension von 20 mmHg dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der kontralaterale LDF oberhalb der 30 %-Marke bleibt, während der ipsilaterale LDF bereits mit Erreichen des 20 mmHg-Niveaus die Blutflussgrenze des Energiemetabolismus unterschreitet.



**Abb. 9:** Verlauf von Blutdruck und LDF während Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO

Verlauf von ipsi- und kontralateralem zerebralem Blutfluss gemessen mit Laser-Doppler (LDF) in Korrelation zur Blutdruckabnahme. Während der Hypotension ist der LDF-Abfall ipsilateral (auf der Seite der verschlossenen A. carotis) deutlich stärker als kontralateral. Das Niveau von 30 % LDF und 20 mmHg Blutdruck sind mit der gestrichelten Linie angedeutet.

Neben Blutdruckabfall und beidseitigen LDF-Änderungen wurde auch das entzogene Blutvolumen registriert. Da zur Konstanthaltung des Blutdrucks ein ständiges Entziehen und Re-Infundieren des Bluts nötig war, wurden das minimal und maximal entzogene Volumen notiert, aus diesen der Mittelwert ermittelt und verglichen. Das mittlere entzogene Blutvolumen betrug  $6,8 \pm 1,8$  ml bzw.  $20,7 \pm 5,3$  ml·kg KGW<sup>-1</sup>. Abhängig von der Tiefe des erreichten Blutdrucks war das benötigte Blutvolumen bezogen auf das Körpergewicht größer (vgl. Tab 4).

	Blutvolumen [ml]	Blutvolumen [ml·kg KGW <sup>-1</sup> ]
7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg	5,9 ± 1,8	18,0 ± 5,4
7 d 3-VO / 15 min 40 mmHg	6,8 ± 0,9	19,0 ± 3,0
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	8,7 ± 2,1	23,3 ± 4,9
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg	7,5 ± 0,9	26,1 ± 2,1* <sup>•</sup>
7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	6,3 ± 2,2	21,3 ± 5,5

**Tab. 4:** Zu entziehendes Blutvolumen zum Erreichen eines Blutdrucks von 50 - 20 mmHg  
Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3 - 7 Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitneys U-Test zur 50 mmHg Hypotension sind mit \* für p < 0,05; zur 40 mmHg Hypotension mit • für p < 0,05 gekennzeichnet.

#### 4.1.3.3 Regionale ATP-Messung

Für die vier Versuchsgruppen wurde in jeweils sechs Ebenen der ATP-Gehalt bestimmt. Nach einer fünfzehnminütigen Hypotension von 50, 40 und 30 mmHg traten keine ATP-Defizite auf, während bei 20 mmHg alle Versuchstiere (n = 3) ein ipsilaterales ATP-Defizit zeigten (Abb. 10). Das mittlere Infarktvolume lag bei  $239,5 \pm 216,7 \text{ mm}^3$  bzw.  $38,1 \pm 33,4 \%$  des kontralateralen Hirnvolumens (vgl. Abb. 11).

#### 4.1.4 Einfluss der Hypotensionsdauer

Um den Einfluss einer längeren Hypotension zu untersuchen, wurde eine dreißigminütige Hypotension von 30 mmHg (7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg) durchgeführt.

##### 4.1.4.1 Einfluss der Hypotensionsdauer auf die Blutparameter

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck lag vor sowie während der dreißigminütigen Hypotension von 30 mmHg im Normalbereich (vgl. Tab. 5).

Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck fiel in dieser Gruppe von  $45,0 \pm 2,7 \text{ mmHg}$  auf  $28,7 \pm 15,1 \text{ mmHg}$  ab, also in einem Bereich, vergleichbar mit der fünfzehnminütigen Hypotension von 30 mmHg ( $22,3 \pm 3,2 \text{ mmHg}$ ; vgl. Tab. 5).

Der arterielle pH fiel von  $7,41 \pm 0,05$  auf  $7,11 \pm 0,23$ , wobei dieser Abfall nicht signifikant war, obwohl deutlich niedrigere pH-Werte als bei fünfzehnminütiger Hypotension ( $7,32 \pm 0,02$ ) erreicht wurden (vgl. Tab. 5).

Basalwerte unter Normotension	Blutdruck [mmHg]	PaO <sub>2</sub> [mmHg]	PaCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	120,0 ± 8,7	119,0 ± 5,6	37,3 ± 2,9	7,40 ± 0,02
7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	103,3 ± 20,8	111,7 ± 8,0	45,0 ± 2,7	7,41 ± 0,05
Hypotension				
7 d 3-VO / 15 min 30 mmHg	29,2 ± 0,7	107,0 ± 19,2	22,3 ± 3,2*	7,32 ± 0,02
7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg	29,2 ± 0,4	105,7 ± 20,8	28,7 ± 15,1	7,11 ± 0,23

**Tab. 5:** Auswirkung einer fünfzehn- oder dreißigminütigen Hypotension von 30 mmHg auf die arteriellen Blutparameter Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO<sub>2</sub>) und pH eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3 Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test zu den Werten unter Normotension sind mit \* für p < 0,05 gekennzeichnet.

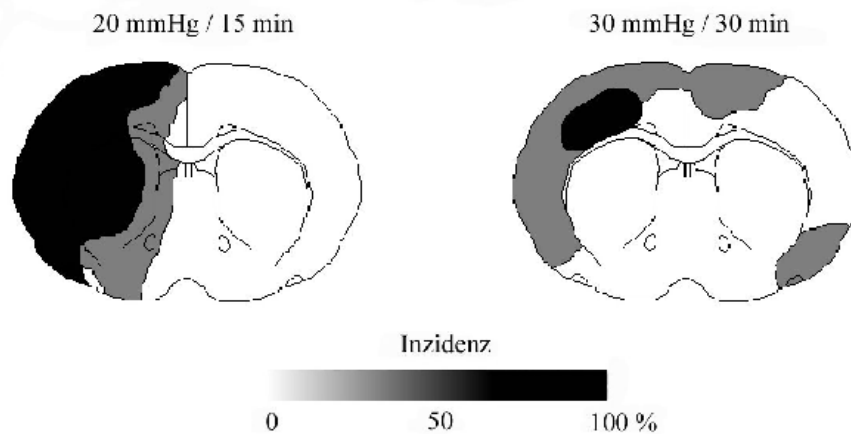
#### 4.1.4.2 Messwerte während der Hypotension

Im Vergleich der beiden Gruppen mit einer Hypotension von 30 mmHg erkennt man, dass die Dauer der Hypotension weder ipsi- (7d 3-VO /15 min 30 mmHg: 21,3 ± 6,5 %; 7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg: 35,3 ± 9,9 %) noch kontralateral (7d 3-VO /15 min 30 mmHg: 32,7 ± 9,1 %; 7 d 3-VO / 30 min 30 mmHg: 47,2 ± 12,7 %) einen Einfluss auf den Abfall des lokalen Blutflusses hat. Auch das entzogene Blutvolumen lag im gleichen Bereich (vgl. Tab. 4).

#### 4.1.4.3 Regionale ATP-Messung

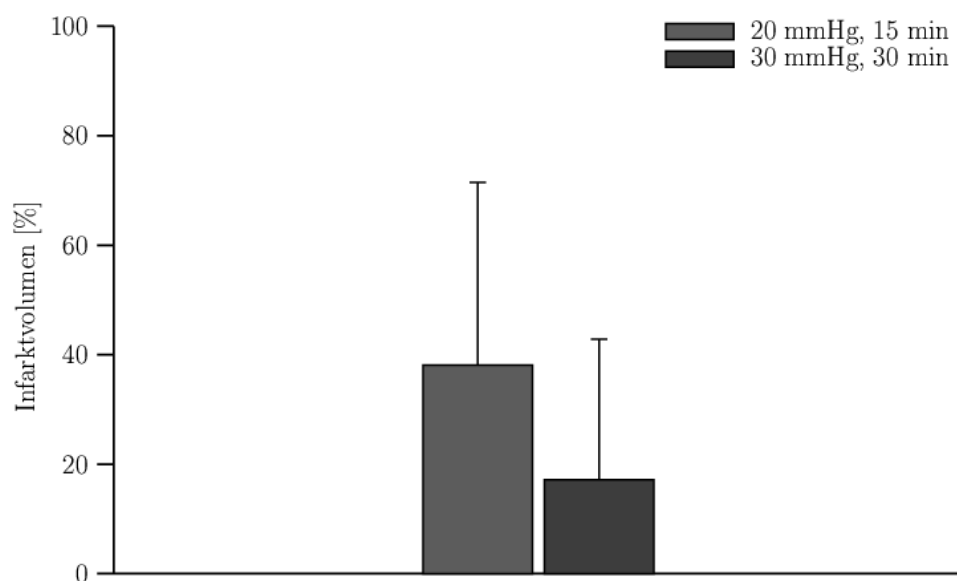
Wie in 4.1.3.3 erwähnt ergab eine fünfzehnminütige Hypotension von 30 mmHg kein ATP-Defizit, während bei 20 mmHg ein ipsilaterales ATP-Defizit bei allen Tieren zu verzeichnen war. Bei der Kombination von 30 Minuten mit 30 mmHg war ebenfalls ein ATP-Defizit zu verzeichnen, allerdings nur in zwei von drei Tieren (66,7 %). Zudem zeigte ein Tier einen beidseitigen Infarkt (vgl. Abb. 10). Das mittlere Infarktvolumen lag bei 128,0 ± 194,7 mm<sup>3</sup> bzw. 17,2 ± 25,7 % des kontralateralen Hirnvolumens (vgl. Abb. 11).





**Abb. 10:** Inzidenz des ATP-Defizits nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg und dreißigminütiger Hypotension von 30 mmHg

Die Regionen mit einem ATP-Gehalt von  $< 0,5 \mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$  wurden in Hirnschnitten bei jedem Tier der Gruppen ( $n = 3$ ) umfahren und übereinander gelegt, um die regionale Inzidenz für das Auftreten eines ATP-Defizits zu verdeutlichen. Bei der Hypotension von 20 mmHg liegt das ATP-Defizit streng begrenzt in der ipsilateralen Hemisphäre.



**Abb. 11:** Infarkt volumen nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg und dreißigminütiger Hypotension von 30 mmHg eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$  Tiere pro Versuchsgruppe).

## 4.2 Behandlungsstudie

Insgesamt wurden für die Behandlungsstudie 42 Tiere eingesetzt, von denen 16 Tiere als Vergleichsgruppen (Kontrolle; 1 h 3-VO; 7d 3-VO / GM-CSF; 7d 3-VO / Ringer) für die autoradiographische CBF-Messung dienten. Im Infarktmodell wurden 26 Tiere eingesetzt, die nach der 3-VO entweder GM-CSF (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF; n = 12) oder Ringer-Infusionslösung (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer; n = 14) erhielten. Nach einer Woche wurde durch Blutdrucksenkung auf 20 mmHg ein hämodynamischer Infarkt erzeugt, der sich in einer ATP-Depletion und einem regionalen Rückgang des zerebralen Blutflusses widerspiegelte.

### 4.2.1 Drei-Gefäß-Okklusion

Die gemessenen Werte des ipsilateralen LDF-Abfalls und des Gewichtsverlaufs nach 3-VO lagen für beide Behandlungs- sowie für alle Vergleichsgruppen im selben Bereich (vgl. Tab. 6). Der durchschnittliche Gewichtsverlust während einer Woche lag bei 4,1 % und war somit höher als in der Literatur angegeben (BUSCH et al., 2003).

Gruppe	Gewichtsverlust [%] nach 7d 3-VO	LDF ipsi [%] nach 3-VO
Kontrolle	—	—
1 h 3-VO	—	61,4 ± 9,2
7 d 3-VO / Ringer	4,1 ± 3,0	63,4 ± 14,8
7 d 3-VO / GM-CSF	2,7 ± 3,2	62,8 ± 11,1
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	4,4 ± 2,5	51,8 ± 12,3
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	4,1 ± 3,1	57,9 ± 13,7

**Tab. 6:** Gewichtsverlust innerhalb einer Woche sowie ipsilateraler Blutflussabfall (LDF ipsi) unmittelbar nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 4 - 14 Tiere pro Versuchsgruppe).

### 4.2.2 Einfluss der durch GM-CSF akzelerierte Arteriogenese auf einen hämodynamischen Infarkt

Im Modell der fünfzehnminütigen Hypotension von 20 mmHg wurden mit Ringerlösung und mit GM-CSF behandelte Tiere untersucht, um den Einfluss der durch GM-CSF akzelerierten Arteriogenese auf die metabolische und hämodynamische Situation während eines hämodynamischen Schlaganfalls zu charakterisieren.

#### 4.2.2.1 Einfluss der Hypotension auf die Blutparameter

Die Werte für den arteriellen Kohlendioxid-, Sauerstoffpartialdruck und pH lagen sowohl vor als auch nach Durchführung der Hypotension bei beiden Gruppen weitestgehend im gleichen Wertebereich (vgl. Tab. 7). Eine Ausnahme bildet der arterielle Kohlendioxidpartialdruck, der nach Hypotension deutlich niedriger in der GM-CSF behandelten Gruppe (17,3 ± 1,9 mmHg) war als in der mit Ringerlösung behandelten (21,4 ± 5,3 mmHg; p < 0,05). Während der Hypotension sanken in beiden Gruppen die Werte des Kohlendioxidpartialdrucks und in der mit Ringerlösung behandelten Gruppe der pH signifikant auf Werte um 19,5 ± 4,5 mmHg bzw. 7,30 ± 0,08 ab (p < 0,05; vgl. Tab. 7).

Normotension	Blutdruck [mmHg]	PaO <sub>2</sub> [mmHg]	PaCO <sub>2</sub> [mmHg]	pH
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	108,6 ± 6,3	140,2 ± 40,5	39,7 ± 4,6	7,41 ± 0,03
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	120,4 ± 7,5*	146,2 ± 43,0	40,8 ± 6,3	7,42 ± 0,03
Hypotension				
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	20,2 ± 0,4	104,6 ± 28,6	21,4 ± 5,3°	7,29 ± 0,06°
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	20,3 ± 0,4	104,9 ± 21,8	17,3 ± 1,9°*	7,31 ± 0,10

**Tab. 7:** Auswirkung einer fünfzehnminütigen Hypotension von 20 mmHg auf die arteriellen Blutparameter Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO<sub>2</sub>) und pH bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren eine Woche nach 3-VO

Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12 - 14 Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test zu den Werten unter Normotension sind mit mit ° für p < 0,05; nach Mann Whitneys U-Test zwischen den Gruppen mit \* für p < 0,05 gekennzeichnet.

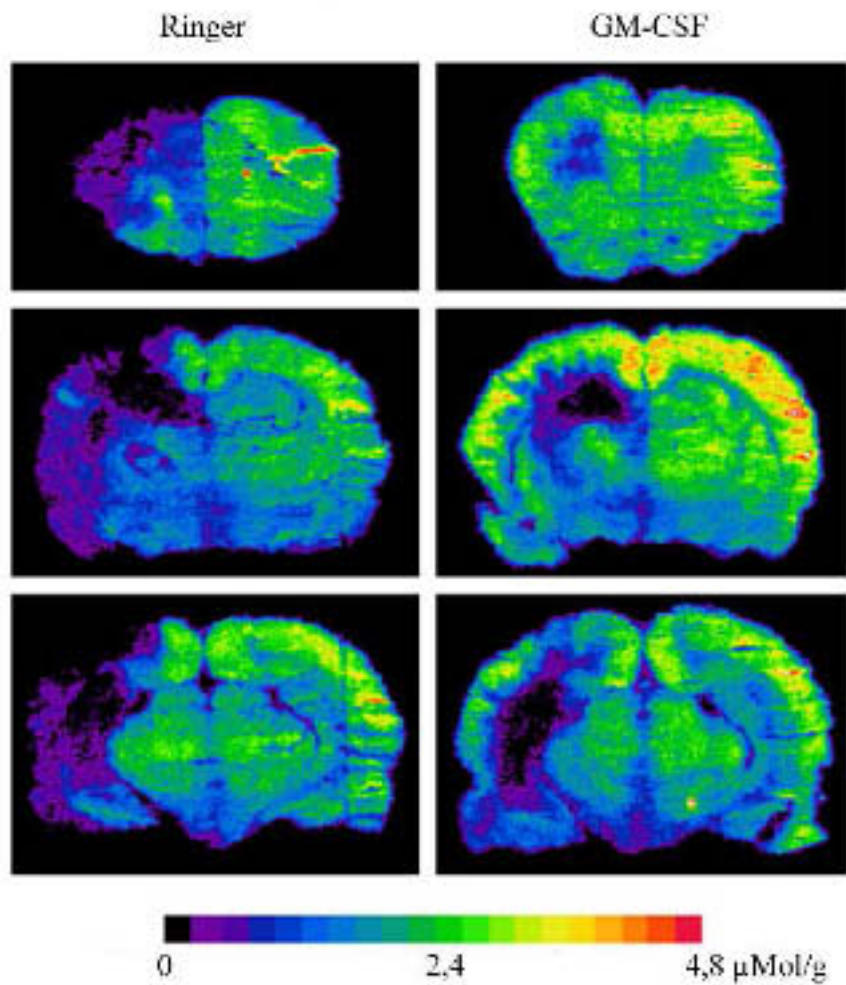
#### 4.2.2.2 Messwerte während der Hypotension

Der Ausgangs-Blutdruck der beiden Gruppen war unterschiedlich hoch (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF: 120 ± 8 mmHg; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer: 109 ± 6 mmHg; p < 0,05), was sich in der prozentualen Blutdrucksenkung widerspiegelte (behandelt: 16,9 ± 1,1 %; unbehandelt: 18,6 ± 1,3 %; p < 0,005). Der erreichte Blutdruck lag allerdings bei beiden Gruppen eng an der gesetzten 20 mmHg-Marke (vgl. Tab. 7).

Zwischen den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das mittlere entzogene Blutvolumen (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer: 26,1 ± 4,7 ml·kg<sup>-1</sup> KGW; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF: 25,7 ± 3,8 ml·kg<sup>-1</sup> KGW) und den ipsilateralen LDF-Abfall (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF: 17,7 ± 8,3 %; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer: 14,5 ± 5,0 %). Der kontralaterale LDF-Abfall war dagegen in der mit Ringerlösung behandelten Gruppe (40,0 ± 12,2 %) deutlich geringer (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF: 25,5 ± 11,6 %; p < 0,05).

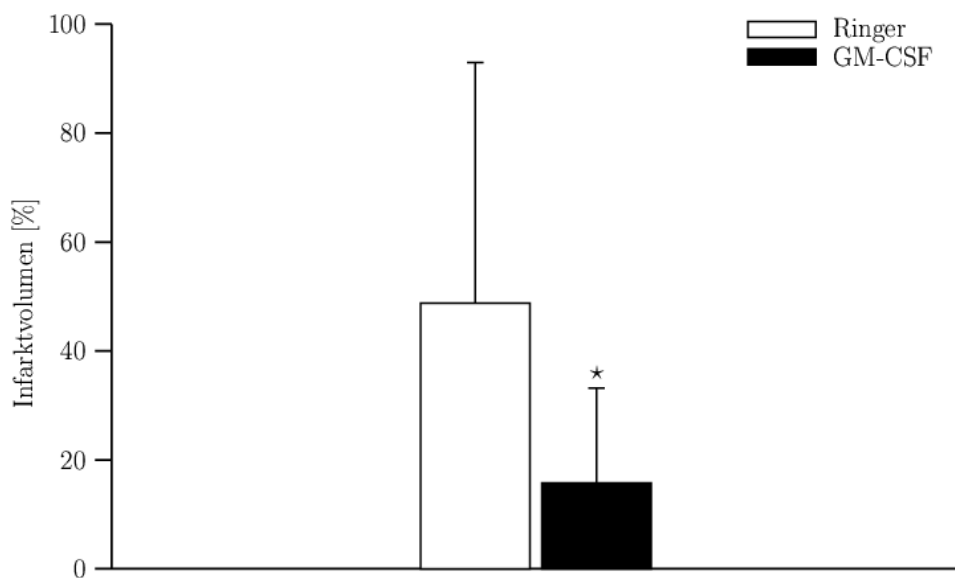
#### 4.2.2.3 Regionale ATP-Messung

Das Infarkt volumen der einzelnen Tiere wurde über den regionalen ATP-Verlust im Gehirn berechnet (vgl. 3.3.2.1). Repräsentative digitale Bilder der ATP-Biolumineszenz für beide Behandlungsgruppen sind in Abb. 12 dargestellt.

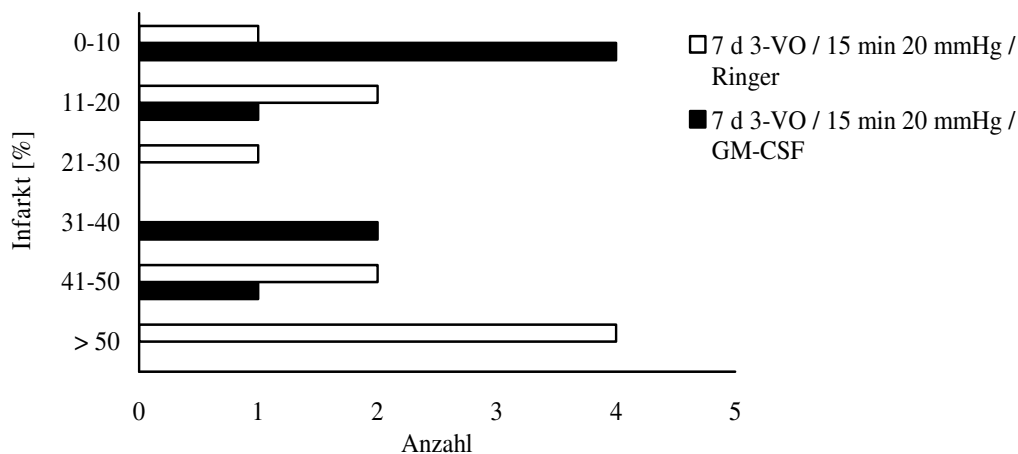


**Abb. 12:** Vergleich des ATP-Defizit nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren  
 Repräsentative Bilder einer ATP-Biolumineszenz; Ebene 1, 4 und 6. Zur besseren Veranschaulichung der regional unterschiedlichen ATP-Konzentration wurden die angefertigten Schwarz-Weiß-Bilder im Bildbearbeitungsprogramm in Farbbilder konvertiert.

Mit einem absoluten Infarkt volumen von  $85,3 \pm 93,2 \text{ mm}^3$  waren die zerebrale Schädigung nach Hypotension in der GM-CSF-Gruppe ( $n = 8$ ) deutlich geringer als in der mit Ringerlösung behandelten Gruppe ( $n = 10$ ;  $277,5 \pm 239,1 \text{ mm}^3$ ;  $p < 0,05$ ). Auch wenn das Infarkt volumen in Relation zum Volumen der kontralateralen Hemisphäre gesetzt wurde, erhielt man einen signifikanten Unterschied ( $15,8 \pm 17,4 \%$  zu  $48,8 \pm 44,2 \%$ ;  $p < 0,05$ ; vgl. Abb. 13). Insbesondere fiel auf, dass in der mit GM-CSF behandelten Gruppe jeweils zwei Tiere (insgesamt 50 %) mit einem Infarkt von weniger als 1,5 % bzw. ohne Infarkt waren, während alle mit Ringerlösung behandelten Tiere einen Infarkt aufwiesen (vgl. Abb. 14).



**Abb. 13:** Infarkt volumen bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO  
Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 8 - 10$  Tiere pro Versuchsgruppe). Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann Whitneys U-Test zwischen den beiden Gruppen sind mit \* für  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

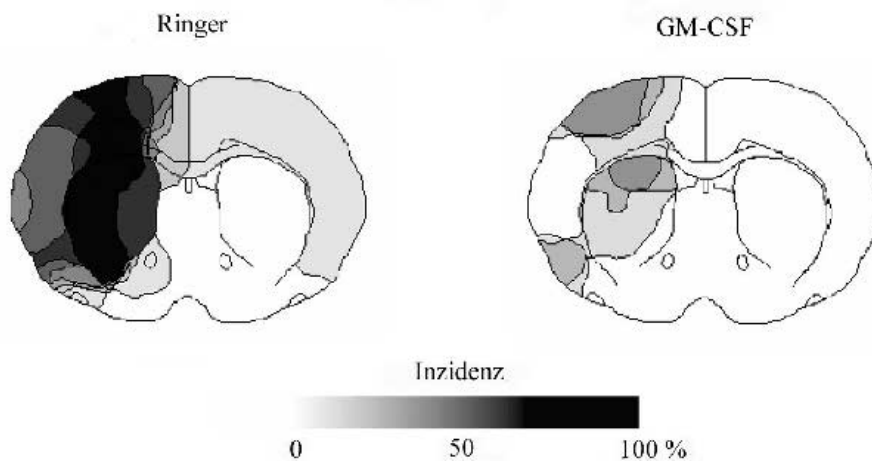


**Abb. 14:** Verteilung der Infarktgröße von mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO

Da der Ausgangs-Blutdruck in den mit GM-CSF behandelten Gruppe deutlich höher war ( $120 \pm 8$  mmHg; 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer:  $109 \pm 6$  mmHg;  $p < 0,001$ ) und dieser einen entscheidenden Einfluss auf die Schwere der Blutdruckabsenkung hat (vgl. 4.1.3.2), wurde das berechnete Infarkt volumen in Bezug zur absoluten Blutdruckabsenkung gesetzt und die resultierenden Werte miteinander verglichen. Dadurch wurde der Unterschied

zwischen mit GM-CSF ( $0,8 \pm 0,9 \text{ mm}^3 \cdot \text{mmHg}^{-1}$ ) und Ringerlösung behandelten Tieren noch deutlicher ( $3,1 \pm 2,5 \text{ mm}^3 \cdot \text{mmHg}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ).

Die regionale Verteilung des ATP-Verlustes auf Höhe des Striatums ist in Abb. 15 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einem mit Ringerlösung behandelten Tier auch kontralateral ein deutlicher Infarkt zu verzeichnen war. Zudem zeigte je ein Tier pro Gruppe einen kleineren kontralateralen Infarkt. Doch auch ein Vergleich nur der ipsilateralen ATP-Defizite führte zu einem signifikanten Vorteil für die GM-CSF behandelte Gruppe ( $15,6 \pm 17,6 \%$  vs.  $39,9 \pm 26,4 \%$ ;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 15:** Inzidenz des ATP-Defizits bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO

Die Areale mit einem ATP-Gehalt von  $< 0,5 \mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$  wurden in Hirnschnitten bei jedem Tier der Gruppen ( $n = 8 - 10$ ) umfahren und übereinander gelegt, um die regionale Inzidenz für das Auftreten eines ATP-Defizits zu verdeutlichen.

Zudem wurden quantitative ATP-Messungen in ausgewählten Hirnregionen zur besseren Veranschaulichung der empfindlichsten Regionen durchgeführt (Tab. 8).

Die gemessenen ATP-Werte der mit Ringerlösung behandelten Tiere lagen in allen Hirnregionen mit Ausnahme des G. cinguli, des N. septalis und des Hypothalamus deutlich unter den Werten der mit GM-CSF behandelten Tiere. Eine signifikante Reduzierung des ATP-Gehalts war im Bereich des motorischen, somatosensorischen Kortex, parietalen, temporalen und piriformen Kortex, des N. caudatus putamen, des Globus pallidus, des Thalamus und des Hippocampus zu verzeichnen. Im selben Maße lag bei der mit GM-CSF behandelten Gruppe im Bereich des Thalamus, des Hippocampus und des lateralen N. caudatus putamen ein ATP-Verlust vor. Die mit GM-CSF behandelten Tiere wiesen ebenfalls signifikante ATP-Defizite im Bereich des piriformen Kortex, des medialen N. caudatus putamen, des Globus pallidus und des Hypothalamus auf. Zudem zeigten die mit GM-CSF behandelten Tiere im Vergleich zu den mit Ringerlösung behandelten Tieren signifikant höhere ATP-Gehalte im medialen N. caudatus putamen und im Globus pallidus.

	20 mmHg, 15 min	
	Ringer	GM-CSF
Ant. G. cinguli	1,91 ± 1,10	2,30 ± 0,90
Post. G. cinguli	2,23 ± 1,14	2,33 ± 0,89
Parietaler Kortex	0,46 ± 0,52▪	1,45 ± 1,40
Temporaler Kortex	0,53 ± 0,48▪	1,64 ± 1,52
Piriformer Kortex	0,72 ± 0,43°	1,13 ± 0,68▪
Motorischer Kortex	0,72 ± 0,78°	1,59 ± 1,69
Somatosensorischer Kortex	0,94 ± 0,77°	2,20 ± 1,52
Lat. N. caudatus putamen	0,63 ± 0,46°	1,56 ± 1,41°
Med. N. caudatus putamen	0,74 ± 0,42°	1,40 ± 0,76▪*
Globus pallidus	0,90 ± 0,46°	1,72 ± 0,67▪*
N. septalis	1,87 ± 0,66	2,06 ± 1,04
Hippocampus	0,25 ± 0,13▪	0,46 ± 0,39▪
Thalamus	1,16 ± 0,68°	1,77 ± 0,93°
Hypothalamus	1,37 ± 0,49	1,37 ± 0,76▪

**Tab. 8:** Auswirkung der Hypotension auf den quantitativen ATP-Gehalt ( $\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) in ausgewählten Hirnarealen bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren eine Woche nach 3-VO

Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 8 - 10$ ) sind von der ipsilateralen Hemisphäre erhoben und in  $\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$  Hirngewebe angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zum ant. G. cinguli nach Students t-Test sind mit ° für  $p < 0,05$  und mit ▪ für  $p < 0,005$  gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann Whitneys U-Test zwischen den beiden Gruppen sind mit \* für  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

Die ipsilateralen ATP-Werte wurden ins Verhältnis zum kontralateralen ATP-Gehalt gesetzt, um eventuell vorhandene regionale Unterschiede der normalen ATP-Konzentration auszuschließen (Tab. 9).

Bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren wurde so neben den bereits erwähnten Strukturen der Thalamus als Region mit signifikant reduziertem ATP-Gehalt identifiziert. Bei den mit GM-CSF behandelten Tieren waren zusätzlich der parietale, temporale, somatosensorische und piriforme Kortex sowie der Thalamus betroffen.

	20 mmHg, 15 min	
	Ringer	GM-CSF
Ant. G. cinguli	90,6 ± 26,4	97,5 ± 10,2
Post. G. cinguli	94,5 ± 9,7	98,7 ± 14,4
Parietaler Kortex	38,9 ± 53,7 <sup>▪</sup>	56,9 ± 46,9 <sup>°</sup>
Temporaler Kortex	35,9 ± 37,4 <sup>▪</sup>	57,8 ± 44,4 <sup>°</sup>
Piriformer Kortex	40,6 ± 29,7 <sup>▪</sup>	73,4 ± 28,4 <sup>°*</sup>
Motorischer Kortex	38,3 ± 37,7 <sup>°</sup>	61,3 ± 48,2 <sup>°</sup>
Somatosensorischer Kortex	55,2 ± 42,5 <sup>°</sup>	73,7 ± 37,0 <sup>°</sup>
Lat. N. caudatus putamen	35,5 ± 35,1 <sup>▪</sup>	66,0 ± 44,1 <sup>°</sup>
Med. N. caudatus putamen	39,2 ± 32,2 <sup>▪</sup>	68,6 ± 32,3 <sup>°</sup>
Globus pallidus	44,0 ± 31,6 <sup>▪</sup>	81,3 ± 25,5 <sup>°*</sup>
N. septalis	96,8 ± 7,9	99,4 ± 6,7
Hippocampus	28,8 ± 23,9 <sup>▪</sup>	30,0 ± 33,7 <sup>▪</sup>
Thalamus	63,1 ± 20,0 <sup>▪</sup>	77,9 ± 25,7 <sup>°</sup>
Hypothalamus	89,0 ± 9,2	96,8 ± 10,3

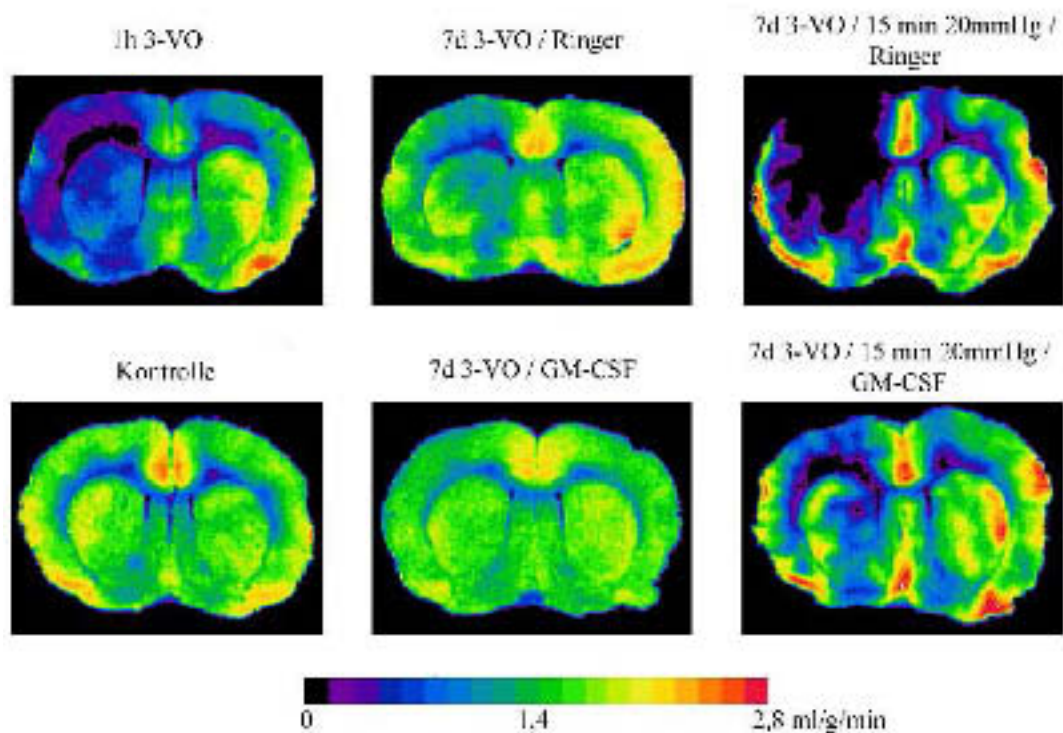
**Tab. 9:** Auswirkung der Hypotension auf den quantitativen ATP-Gehalt (%) in ausgewählten Hirnregionen bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren eine Woche nach 3-VO

Die Werte (Mittelwert ± SD, n = 8 - 10) sind von der ipsilateralen Hemisphäre erhoben und in Prozent der kontralateralen Seite ausgedrückt. Statistisch signifikante Unterschiede zum ant. G. cinguli nach Students t-Test sind mit ° für  $p < 0,05$  und mit ▪ für  $p < 0,005$  gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann Whitneys U-Test zwischen den beiden Gruppen sind mit \* für  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

#### 4.2.2.5 Autoradiographische CBF-Messung

Bei einem Teil der Tiere der Behandlungsstudie wurde der zerebrale Blutfluss während der Hypotension mittels <sup>14</sup>C-IAP-Autoradiographie gemessen. Zum Vergleich 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. Repräsentative Bilder des zerebralen Blutflusses auf Höhe des N. caudatus putamen sind in Abb. 16 dargestellt.





**Abb. 16:** Zerebraler Blutfluss während fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren sowie Tieren direkt und eine Woche nach 3-VO. Repräsentative Bilder einer  $^{14}\text{C}$ -Iodantipyrin-Autoradiographie, Ebene 2. Zur besseren Veranschaulichung des regional unterschiedlichen Blutflusses wurden die angefertigten Schwarz-Weiß-Bilder im Bildbearbeitungsprogramm in Farbbilder konvertiert.

Da die Werte der Tiere eine Woche nach 3-VO (7 d 3-VO / Ringer; 7 d 3-VO / GM-CSF) die Situation unter Normotension vor Auslösung einer Hypotension widerspiegeln, und da der zerebrale Blutfluss sich unter einwöchiger Behandlung mit GM-CSF besser erholt (vgl. Abb. 16 und Tab. 10), wurde der zerebrale Blutfluss während der Hypotension jeweils mit den mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren mit einwöchiger 3-VO verglichen. Der ipsilaterale CBF sank bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren während der Hypotension im Bereich des durch die Aa. cerebri media und posterior versorgten Kortex sowie des N. caudatus putamen und des Hippocampus signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Bei den mit GM-CSF behandelten Tieren bestand auch ein Absinken gegenüber den Tieren ohne Hypotension, der Abfall war aber nicht signifikant. Der kontralaterale CBF sank in beiden Gruppen während der Hypotension nicht signifikant ab. Insgesamt zeigten die mit GM-CSF behandelten Tiere während der Hypotension einen höheren Blutfluss als die mit Ringerlösung behandelten, insbesondere im ipsilateralen Kortex, der von der A. cerebri posterior versorgt wird ( $p < 0,05$ ).

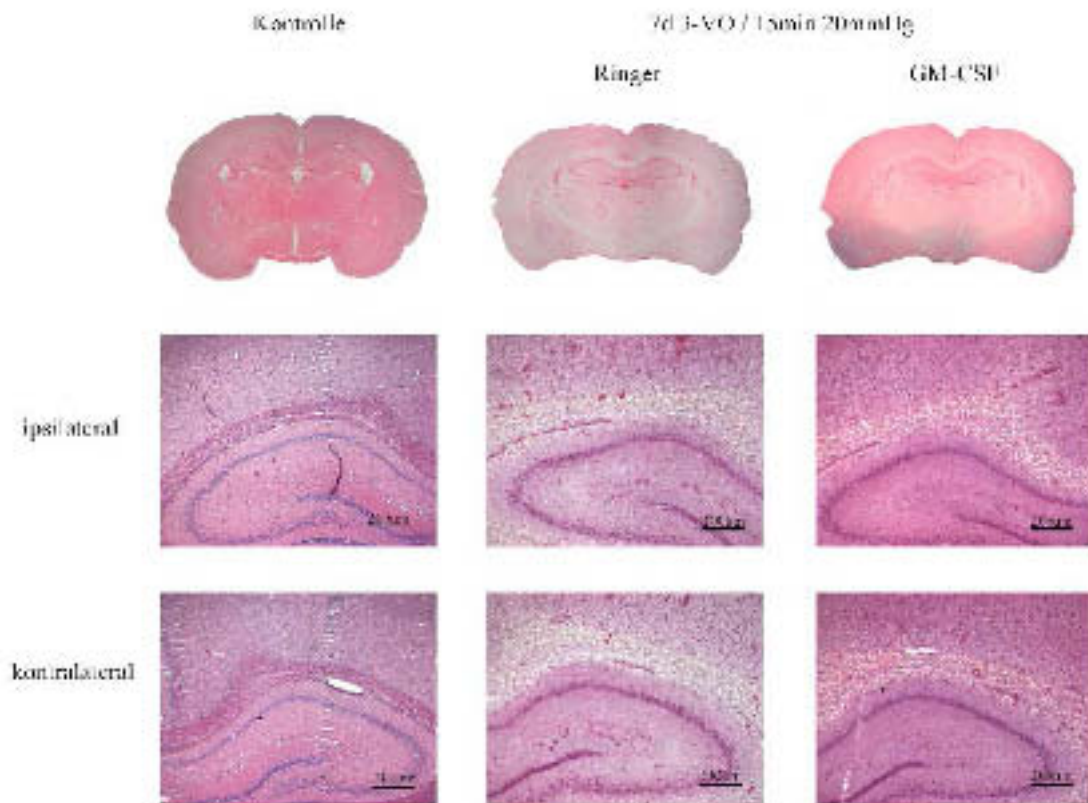
	ACA Kortex		MCA Kortex		PCA Kortex	
	ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra
Kontrolle	1,13±0,45	1,03±0,36	0,83±0,06	0,82±0,12	0,68±0,18	0,78±0,38
1 h 3-VO	0,69±0,17	0,82±0,21	0,33±0,07	0,94±0,17	0,25±0,07	0,80±0,18
7 d 3-VO / Ringer	1,68±0,96	1,67±0,89	0,75±0,45	1,62±0,87	0,53±0,31	0,88±0,28
7 d 3-VO / GM-CSF	1,81±1,03	1,64±0,77	0,92±0,39	1,14±0,35	0,64±0,25	0,94±0,25
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	0,73±0,33	0,81±0,34	0,20±0,09*	1,06±0,31	0,12±0,04*	0,55±0,33
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	1,59±0,46	1,73±0,31▪	0,62±0,38	1,92±0,20▪	0,41±0,20▪	1,15±0,29
	N. caudatus putamen		Hippocampus		Hypothalamus	
	ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra
Kontrolle	0,80±0,15	0,86±0,17	0,56±0,12	0,50±0,13	0,66±0,17	0,66±0,14
1 h 3-VO	0,33±0,08	0,92±0,06	0,27±0,07	0,66±0,16	0,33±0,08	0,74±0,16
7 d 3-VO / Ringer	0,72±0,43	1,40±0,72	0,99±0,23	0,91±0,61	0,53±0,18	1,09±0,78
7 d 3-VO / GM-CSF	1,04±0,54	1,47±0,71	0,61±0,25	0,85±0,35	0,56±0,18	0,82±0,31
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer	0,25±0,12*	1,05±0,49	0,11±0,05*	0,52±0,26	0,40±0,12	1,06±0,51
7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF	0,62±0,24	1,88±0,25	0,25±0,13	1,19±0,24▪	0,75±0,09	1,59±0,20

**Tab. 10:** Auswirkung der fünfzehnminütigen Hypotension von 20 mmHg auf den zerebralen Blutfluss in ausgewählten Hirnarealen im Vergleich zu Kontrolltieren sowie Tieren direkt und eine Woche nach 3-VO

Die Werte (Mittelwert ± SD, n = 3 - 4 pro Gruppe) sind in  $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitneys U-Test zwischen 7 d 3-VO / Ringer und 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer sind mit \* für  $p < 0,05$ ; zwischen 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer und 7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF mit ▪ für  $p < 0,05$  gekennzeichnet.

#### 4.2.2.5 Histologische Färbung

In beiden Gruppen wurden in sechs Ebenen H.-E. Färbungen durchgeführt. Es konnten in keiner der beiden Gruppen histologisch erkennbare morphologische Veränderungen beobachtet werden (vgl. Abb. 17).



**Abb. 17:** Histologische Darstellung nach fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg eine Woche nach 3-VO bei mit Ringerlösung und GM-CSF behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren  
Repräsentative Bilder der H.-E. Färbung, Ebene 5.