

5 Diskussion

Ein Schlaganfall ereignet sich bei einem Absinken des lokalen zerebralen Perfusionsdrucks und einem damit verbundenem Unterschreiten des Schwellenwerts. Im betroffenen Gebiet kommt es zu einem Sauerstoff- und Energiemangel mit nachhaltiger Schädigung der Neurone. Besonders für Patienten mit bestehender Stenose der hirnversorgenden Gefäße stellt der Schlaganfall die größte drohende Gefahr dar. Trotz intensiver medizinischer Forschung beschränken sich die zurzeit bestehenden therapeutischen Maßnahmen meist auf eine symptomatische Behandlung. Zudem konnte bisher in kontrollierten klinischen Studien mit Ausnahme der thrombolytischen Therapie keine signifikante Verbesserung der ischämischen zerebralen Durchblutungsstörungen durch eine medikamentöse Behandlung erreicht werden (FISHER und SCHAEBITZ, 2000; HACKE et al., 1999; SCHIELE et al., 2000). Eine Stabilisierung der kritischen Durchblutungsverhältnisse wäre prophylaktisch erstrebenswert, um das Auftreten eines Schlaganfalls im Vorfeld zu verhindern.

Im Rattenmodell der Drei-Gefäß-Okklusion konnte gezeigt werden, dass bei bestehendem Verschluss von drei großen hirnzuführenden Gefäßen durch das spontane Einsetzen der Arteriogenese die Perfusion im Gehirn verbessert wird (BUSCH et al., 2003). Durch die dargestellten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob und in welchem Maße das Gehirn durch die physiologisch einsetzende sowie therapeutisch akzelerierte Arteriogenese vor einem hämodynamischen Schlaganfall geschützt werden kann.

5.1 Reproduzierbarkeit der Drei-Gefäß-Okklusion

Das Modell der Drei-Gefäß-Okklusion (3-VO) wurde erstmals von KATAWA et al. erwähnt (KAWATA et al., 1996). Dabei stellten sie fest, dass in Ruhe der zerebrale Blutfluss zur adäquaten Versorgung des Gehirns ausreichte, während die zerebrovaskuläre Reaktivität gemessen unter Einwirkung von Azetazolamid eine Woche nach 3-VO deutlich reduziert war. Der genaueren Ursache dieser Beobachtung gingen sie nicht weiter nach. Erst BUSCH et al. nutzen das 3-VO-Modell zur Untersuchung der zerebralen Arteriogenese (BUSCH et al., 2003). Sie zeigen, dass der kortikale Blutfluss gemessen mittels Laser-Doppler bei der 3-VO ipsilateral zur verschlossenen A. carotis um ca. 50 % absinkt. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. In der Etablierungsstudie sank während der 3-VO der ipsilaterale Laser-Doppler-Fluss um 47 - 57 %, in der Behandlungsstudie um 52 - 63 %. Dies spiegelt die hohe Reproduzierbarkeit der Methode wider.

Neben Blutflussmessung mittels Laser-Doppler wurde in der Behandlungsstudie zusätzlich in einer Gruppe der zerebrale Blutfluss (CBF) mittels Autoradiographie eine Stunde nach 3-VO gemessen (Gruppe 1 h 3-VO). Dabei lag der CBF im Bereich des ipsilateralen Kortex, also in dem Bereich, in dem während der 3-VO mittels Laser-Doppler-Sonde der Blutfluss gemessen wurde, bei $0,33 \pm 0,07 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Geht man davon aus, dass vor 3-VO der gemessene ipsilaterale CBF dem der kontralateralen Seite ($0,94 \pm 0,17 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) entspricht, dann ist das Verhältnis von ipsi- zu kontralateralem CBF der eigentliche Blutflussabfall. In diesem Fall lag demnach der Flussabfall bei $37,5 \pm 10,4 \%$. Dies entspricht den in der Literatur gemachten Angaben (BUSCH et al., 2003).

Das operative Vorgehen bei der 3-VO stellt einen nicht unerheblichen Eingriff dar. Bei der Elektrokoagulation der A. vertebrales kann es zu geringgradigen lokalen Blutungen und Verbrennungen des umliegenden Gewebes kommen. Daneben entstehen große Wundhöhlen im Bereich der Zugänge. Unmittelbar nach der Operation erleiden die Tiere daher zunächst

einen Gewichtsverlust. Doch innerhalb von zwei Tagen post operationem erholen sich die Tiere wieder und zeigen ein normales Verhalten. Laut Literatur liegt nach einer Woche Erholungszeit der operativ bedingte Gewichtsverlust bei 2 % (BUSCH et al., 2003). Bei den Tieren in der vorliegenden Arbeit lag ein einwöchiger Gewichtsverlust von $0,9 \pm 2,9$ bis $4,6 \pm 1,0$ % vor. Bei einigen Tieren, die von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden, lag ein höherer Gewichtsverlust vor (> 10 %), der allerdings von Störungen des Allgemeinbefindens begleitet wurde und somit nicht im direkten Zusammenhang der 3-VO stand.

5.2 Entwicklung eines Modells zur Erzeugung eines hämodynamischen Schlaganfalls

Durch ein starkes Absinken des zerebralen Perfusionsdrucks in Folge einer Gefäßstenose oder einer anderen hämodynamischen Störung kann es im Gehirn zum hämodynamischen Schlaganfall kommen (POECK und HACKE, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte zur Untersuchung des Einflusses der Arteriogenese auf den hämodynamischen Schlaganfall experimentell ein Schlaganfall bei Ratten erzeugt werden. Bei den bekannten Tiermodellen zur Erzeugung einer hämodynamisch bedingten zerebralen Ischämie wird die Ischämie durch Okklusion verschiedener Gefäße erreicht. Bei der Ratte kann dies durch den Verschluss beider Vertebralarterien und beider Karotiden (PULSINELLI und BRIERLEY, 1979), der Aorta (WADE et al., 1975) oder beider Karotiden in Kombination mit einer Basilarisokklusion (KAMEYAMA et al., 1985) geschehen. Die Okklusion beider Karotiden reicht bei der Ratte nur in Kombination mit einer systemischen Blutdruckabsenkung zur Infarktauslösung aus (SMITH et al., 1984). Doch keines der beschriebenen Modelle stützt sich auf bereits bestehende Gefäßverschlüsse, sondern diese sind nur kurz während der Dauer der Infarktauslösung vorhanden. Da in der vorliegenden Arbeit die zerebrale Arteriogenese durch eine chronische Hypoperfusion induziert durch 3-VO aktiviert werden sollte (BUSCH et al., 2003), war demnach eine Voraussetzung, dass ein Schlaganfall an Tieren ausgelöst werden sollte, bei denen sieben Tage zuvor beide Vertebralarterien und eine A. carotis im Rahmen der 3-VO zur Induktion der Arteriogenese permanent verschlossen wurden. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ischämie durch hämorrhagische Absenkung des systemischen Blutdrucks ausgelöst.

5.2.1 Einfluss der spontanen Arteriogenese

Um einen Einblick über die Auswirkungen einer Drei-Gefäß-Okklusion (beidseitige Okklusion der Vertebralarterien und einseitige Ligation der A. carotis) in Kombination mit einer hämorrhagischen Hypotension auf die zerebrale Blutversorgung zu bekommen, wurde in einer Gruppe (1 h 3-VO / 15 min 50 mmHg) eine 3-VO mit unmittelbar folgender Blutdruckabsenkung auf 50 mmHg durchgeführt. Die Höhe der Blutdruckabsenkung auf 50 mmHg wurde in Anlehnung an SMITH et al. ausgewählt, die durch die Kombination Blutdruckabsenkung mit beidseitigem Verschluss der A. carotis eine globale Ischämie erzeugen (SMITH et al., 1984). Die alleinige Blutdruckabsenkung auf 50 mmHg führt dagegen zu keinen neurologischen Schäden (MENDELOW et al., 1984). Durch die zeitgleiche Kombination von 3-VO und Blutdruckabsenkung konnte nach Evaluation des zerebralen ATP-Gehalts bei 60 % der Tiere ein lokal umschriebenes, ipsilaterales ATP-Defizit festgestellt werden. Auf Grund dieses Ergebnisses wurden weitere Versuche durchgeführt, wobei zwischen der 3-VO und der Blutdruckabsenkung eine Erholungszeit von

sieben Tage lag (7 d 3-VO / 15 min 50 mmHg). Danach war allerdings bei keinem der Tiere ein ATP-Defizit zu verzeichnen.

Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die verbesserte lokale Durchblutung in Folge der Arteriogenese zurückzuführen. BUSCH et al. zeigen, dass im 3-VO Modell innerhalb einer Woche der Durchmesser der ipsilateralen A. cerebri posterior um 39 % von $187 \pm 27 \mu\text{m}$ auf $260 \pm 37 \mu\text{m}$ im Vergleich zu Kontrolltieren wächst (BUSCH et al., 2003). Durch die 3-VO kommt es zu einem Umlenken des Blutstroms und einer Erhöhung der Scherkräfte in der A. cerebri posterior ipsilateral zur verschlossenen A. carotis. In Folge von Arteriogenese kommt es zum Gefäßwachstum mit nachfolgender Absenkung des zuvor erhöhten Gefäßdrucks und einer Normalisierung des Blutflusses. In der vorliegenden Arbeit wurde der CBF eine Woche nach 3-VO autoradiographisch gemessen. Im Bereich des durch die A. cerebri media versorgten Kortex lag er bei $0,75 \pm 0,45 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Gruppe 7 d 3-VO / Ringer). Dies ist eine Flussverbesserung um über das Doppelte. Auch wenn die Flusswerte der Kontrollgruppe ($0,83 \pm 0,06 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nicht ganz erreicht wurden, zeigt diese Beobachtung eine deutliche Flussnormalisierung in Folge des durch Arteriogenese verbesserten Gefäßdurchmessers und erklärt, dass eine Woche nach 3-VO eine Blutdruckabsenkung auf 50 mmHg nicht mehr ausreicht, um eine zerebrale Ischämie mit Verlust der metabolischen Integrität auszulösen.

Um den Blutdruckbereich zur Auslösung eines hämodynamischen Infarktes bei bestehender Hypoperfusion zu erreichen, wurde der Blutdruck schrittweise weiter gesenkt. Bei einem Blutdruck von 20 mmHg traten ipsilaterale ATP-Defizite auf, die auf ein Absinken des lokalen Blutflusses unter den Schwellenwert von $0,2 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ hinweisen (MIES et al., 1984; PASCHEN et al., 1992). Somit lag der Blutdruck außerhalb des autoregulatorischen Bereichs. Der CBF folgt passiv dem vorliegenden Blutdruck (PAULSON et al., 1990) und sinkt demnach in Folge des niedrigen Blutdrucks ab. Dies führt zur Ischämie des betroffenen Versorgungsgebiets. Bereits bei Ratten ohne Gefäßverschluss führt eine dreiminütige Blutdruckabsenkung auf 25 mmHg begleitet von einem isoelektrischem EEG zu schweren strukturellen Veränderungen im Bereich des Hippocampus und zum Teil im Hilus dentatus und im Thalamus (YAMAUCHI et al., 1990). Durch die Gefäßverschlüsse im vorliegenden Hypotensionsmodell der 3-VO ist die Blutversorgung zusätzlich gestört, auch wenn sie durch die arteriogen gewachsene Kollateralverbindung über die A. cerebri posterior verbessert wurde. Daher erstrecken sich die Bereiche des ATP-Defizit auf große Teile der Kortex, des N. caudatus putamens, des Globus pallidus und des Hippocampus. Ob in diesen Bereichen nach einer Reperfusion bleibende strukturelle Schäden bleiben, kann nicht gesagt werden. Dazu bedarf es weiterer Untersuchungen mit Reperfusion nach Hypotension und Überleben der Tiere.

5.2.2 Veränderung der Blutparameter durch Hypotension

Lokale zerebrale Durchblutungsstörung treten bei einem Schlaganfall oder einer Hypotension auf. In Folge des Sauerstoffmangels wird der Stoffwechsel auf anaerobe Glykolyse mit nachfolgender Azidose umgestellt und der Anteil der sauren Metabolite wie Laktat steigt im Blut an (BACK et al., 1994; GARCIA, 1984; HOSSMANN, 1987; HOSSMANN et al., 1985; NEDERGAARD et al., 1986; SIESJO, 1992). In der vorliegenden Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer lokalen Azidose kam. Der dazu notwendige Nachweis von Laktat im lokalen venösen Blut wurde allerdings nicht vorgenommen.

Eine weitere beobachtete Veränderung war das Absinken des Kohlendioxidpartialdrucks während der Hypotension. Sowohl mit als auch ohne einseitige Karotisokklusion kommt es bei kontrollierter Beatmung durch eine fünfzehnminütige Hypotension auf 40 - 50 mmHg

zum Absinken des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks auf 30 mmHg (MENDELOW et al., 1984). Ähnliche Werte wurden in der vorliegenden Arbeit durch Hypotension in Kombination mit 3-VO erreicht (PaCO₂: 31 - 27 mmHg). Durch eine weitere Blutdruckabsenkung fallen die Werte weiter ab. Die eigenen gemessenen Werte bei fünfzehnminütiger Hypotension von 20 - 30 mmHg (PaCO₂: 22 - 19 mmHg) decken sich mit den Literaturangaben zur Blutdruckabsenkung auf 25 - 35 mmHg, bei der der PaCO₂ auf 19 mmHg sinkt (KAASIK et al., 1970). Diese Beobachtung beruht auf der Tatsache, dass sowohl in den Versuchen der angegebenen Literatur als auch in der vorliegenden Arbeit die Tiere über einen Respirator beatmet wurden. Vor Beginn der Experimente wurde ein Kohlendioxidpartialdruck von ca. 40 mmHg angestrebt, und bei der anschließenden Hypotension wurden die Beatmungparameter nicht mehr verändert. Während der Hypotension ist aufgrund des mangelnden Blutangebotes das Sauerstoffangebot begrenzt. Zudem ist der Abtransport der Stoffwechselprodukte behindert, so dass sich das infolge von anaerober Glykolyse gebildete Laktat anreichert. Tiere unter Spontanatmung würden ihre Atmung der gewechselten Stoffwechsellage anpassen, wobei der Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen Blut konstant bleiben würde. Aus den vorliegenden Daten geht demnach hervor, dass die Tiere hyperventiliert wurden, so dass es zu einer verstärkten Abatmung des Kohlendioxids kam.

5.2.3 Einfluss der Hypotensionsdauer

Neben einer lokalen Azidose im Gehirn kommt es während einer Hypotension aufgrund des geminderten Blutvolumens auch zu einer globalen Azidose. So wurde nach dreißigminütiger Hypotension von 30 mmHg ein pH von 7,11 gemessen. Dies spiegelte sich auch in der ATP-Messung wider. In der Gruppe mit fünfzehnminütiger Hypotension von 20 mmHg traten ATP-Defizite nur ipsilateral zur okkludierten A. carotis auf. Dies lässt den Schluss zu, dass sich der Infarkt auf den Bereich des gestörten Blutflusses konzentriert. Durch die globale Azidose während der länger dauernden, aber von der Blutdruckabsenkung her nicht so tiefen Hypotension (30 mmHg, 30 min) kommt es nicht nur zum Verlust der metabolischen Integrität in der ipsilateralen, sondern auch in der kontralateralen Hemisphäre. In diesem Fall ist nicht der lokale zerebrale Blutfluss, sondern die durch den globalen Blutfluss verursachte Azidose der entscheidende Faktor.

5.2.4 Durchführbarkeit des Modells

Das Ziel der Etablierungsstudie war die Entwicklung eines reproduzierbaren Modells zur Erzeugung eines hämodynamischen Schlaganfalls bei Ratten mit chronischer Hypoperfusion des Gehirns (3-VO). Die ausgewählte Methode der hämorrhagischen Hypotension soll die Situation am Menschen widerspiegeln. Bei Patienten mit einer Stenose der hirnzuführenden Gefäße ereignet sich ein Schlaganfall nicht, wenn das Gefäß plötzlich ganz verschlossen wird, sondern durch den sich allmählich weiter verengenden Gefäßdurchmesser sinkt der zerebrale Blutfluss immer weiter ab. Bei Unterschreitung des Schwellenwerts kommt es zum Erliegen der Perfusion und zum Schlaganfall. Im vorliegenden Modell führt das Absinken des Blutdrucks ähnlich wie bei einer Stenose zum Absinken des Perfusionsdrucks mit nachfolgendem Zusammenbruch der zerebralen Blutversorgung. Es ist bekannt, dass ein kurzfristiges starkes Absinken des Blutdrucks in den frühen Morgenstunden zu einem hämodynamischen Infarkt führen kann (ARGENTINO et al., 1990; EIGENBRODT et al., 2000; HAAPANIEMI et al., 1992).

Um den Effekt der Arteriogenese auf die Akutsituation des Schlaganfalls zu untersuchen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Infarktdarstellung anhand der aussetzenden ATP-

Produktion. Unmittelbar nach Ablauf der Hypotensionszeit wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff eingefroren und der zerebralen ATP-Gehalts mittels Biolumineszenz evaluiert (KOGURE und ALONSO, 1978; PASCHEN, 1990). Die Hypotension führt zum Absinken des zerebralen Blutflusses. Bei einer Durchblutungsabnahme um 80 % bzw. nach Absinken der Durchblutung auf weniger als $20 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ kommt es zum Erliegen des Energiestoffwechsels (MIES et al., 1984; PASCHEN et al., 1992), Verbrauch der ATP-Vorräte und Absterben der Neurone. Die mittels ATP-Biolumineszenz gemessenen Infarkt volumina stellen demnach die Bereiche mit den stärksten Flussabsenkungen dar. Des Weiteren wird durch die Biolumineszenz eine regionale Abstufung des ATP-Gehalts dargestellt. Es wird also mit dieser Methode deutlich, welche Regionen als erstes und stärkstes von der Minderperfusion betroffen sind, während in Regionen mit noch vorhandenem, wenn auch reduziertem ATP-Gehalt der Schwellenwert noch nicht unterschritten ist.

Wesentlich empfindlicher reagiert die Proteinbiosynthese auf einen sinkenden Blutfluss und ist daher ein sensiblerer Infarktindikator (BODSCH et al., 1986; SHARP et al., 2000). Der Schwellenwert für die Hemmung der Proteinsynthese liegt bei 50 % der Ausgangsdurchblutung (MIES et al., 1997; MIES et al., 1991). Dabei ist nicht davon auszugehen, dass Neurone mit erloschener Proteinsynthese auch absterben. Das Absterben der betroffenen Zellen ist im Wesentlichen von der Ischämiedauer, der tatsächlichen Flussminderung und der anschließenden Reperfusion abhängig (HOSSMANN, 1993b). Um experimentell die Proteinsynthese zu messen, erfolgt bei der autoradiographischen Messung eine dreiviertelstündige Inkorporation von radioaktiv markiertem Leuzin, das im Falle eines intakten Proteinstoffwechsels in die Zellen eingebaut wird (MIES, 1995; MIES et al., 1997). Somit ist diese Methode aufgrund des Zeitfaktors zur Infarktdarstellung im akuten Schlaganfall im Gegensatz zu ATP-Biolumineszenz nicht einsetzbar. Sinnvoll wäre die Messung der Proteinsynthese nach erfolgter Reperfusion, um so den während der Hypotension tatsächlich entstanden Schaden darzustellen. Dies beinhaltet wiederum, dass die Tiere nach Hypotension mindestens drei Tage überleben, um den Bereichen mit nur kurzzeitiger Hemmung der Proteinsynthese ausreichend Erholungszeit zu geben.

Eine andere Methode der Infarktdarstellung ist die Vitalfärbung. Dazu wird Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC, 10%) am narkotisierten Tier in die linke Herzkammer injiziert. Über den Blutkreislauf gelangt der Farbstoff in den Körper, wird von den Mitochondrien der intakten Zellen umgebaut und färbt so lebende Zellen rot an. Fünf Minuten nach Injektion kann nach Tötung des Tiers das Hirn entnommen und beurteilt werden. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung. Leider lässt sie nur die Aussage zu, ob die Zellen abgestorben sind oder nicht. Eine Aussage über die gerade vorhandene Stoffwechsellage, die eine indirekte Aussage über die Blutversorgung während des Schlaganfalls zulassen würde, und somit auf das möglicherweise anstehende Absterben lässt sich nicht treffen. Daher wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht zur Infarktdarstellung ausgewählt.

5.3 Einfluss der durch GM-CSF akzelerierten Arteriogenese auf den hämodynamischen Schlaganfall

Der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierende-Faktor wirkt durch Verlängerung des Lebenszyklus von Makrophagen und Monozyten fördernd auf den Prozess der Arteriogenese (BRATTON et al., 1995; FLAD et al., 1998). In der Peripherie wurde am Kaninchenhinterlaufmodell durch die Applikation von GM-CSF die Durchblutungsrate in Folge von

Arteriogenese signifikant gesteigert (BUSCHMANN et al., 2001). Im zerebralen Hypoperfusionsmodell der 3-VO führt GM-CSF neben einem gesteigertem Wachstum der A. cerebri posterior zu einer schnellen Restitution der zerebrovaskulären Reaktivität (BUSCHMANN et al., 2003). Ob und in wie weit sich diese Verbesserung auf einen hämodynamischen Schlaganfall auswirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.3.1 Durch GM-CSF akzelerierte Arteriogenese senkt Infarktgröße

Im Modell der fünfzehnminütigen Hypotension von 20 mmHg wurden eine Woche nach 3-VO mit Ringerlösung (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer) und GM-CSF (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF; 40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) behandelte Ratten verglichen. Die Behandlung wurde jeden zweiten Tag als subkutane Injektion durchgeführt.

Um das Infarktvolumen des hämodynamischen Schlaganfalls zu messen, wurde nach Hypotension eine lokale ATP-Messung mittels Biolumineszenz durchgeführt (KOGURE und ALONSO, 1978; PASCHEN, 1990). Durch die Behandlung mit GM-CSF sank das Infarktvolumen signifikant von 277,5 mm³ auf 85,3 mm³. Prozentual zur kontralateralen Hemisphäre gesehen liegt eine Verkleinerung des Infarktvolumens von 49 % auf 16 % vor. Da es bei einigen sowohl mit Ringerlösung als auch mit GM-CSF behandelten Tieren kontralateral zur verschlossenen A. carotis ebenfalls zu einem lokalen Abfall des ATP-Gehalts unter 0,5 $\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$ kam, wurde zudem nur das ipsilaterale Infarktvolumen verglichen. Dabei ist das Infarktvolumen bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren mit 40 % zwar deutlich geringer, aber im Vergleich zur Behandlung mit GM-CSF (16 %) über doppelt so groß. Dieser deutliche Unterschied zwischen den Gruppen kann auf das Einwirken von GM-CSF auf die Arteriogenese zurückgeführt werden. Durch die Behandlung mit diesem Faktor wächst der Durchmesser der A. cerebri posterior als die wichtigste Kollateralverbindung im Bereich des Circulus arteriosus Willisii innerhalb einer Woche nach 3-VO um 59 μm mehr als ohne Behandlung (BUSCHMANN et al., 2003).

Der Einfluss der vergrößerten Kollateralen spiegelt sich auch in den angefertigten autoradiographischen Messungen des zerebralen Blutflusses wider. Während eine Woche nach 3-VO bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren der CBF im Bereich des von der A. cerebri media versorgten Kortex auf $0,75 \pm 0,45 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer) wieder anstieg, erreichte er bei den mit GM-CSF behandelten Tieren Werte von $0,92 \pm 0,39 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF) und damit das Niveau der Kontrolltiere ($0,83 \pm 0,06 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Auch in den anderen Bereichen, in denen der CBF gemessen wurde, kam es bei den mit GM-CSF behandelten Tieren zu einer vollständigen Wiederherstellung des Blutflusses verglichen mit den Kontrolltieren, während bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren der CBF sich nicht signifikant gegenüber der akuten Situation nach 3-VO verbesserte.

Ein weiterer Einflussfaktor der GM-CSF-Behandlung besteht in Bezug auf die zerebrovaskuläre Reaktivität. Unmittelbar nach 3-VO sinkt diese um 96 % ab und erholt sich ohne Behandlung innerhalb einer Woche nicht (BUSCH et al., 2003). Durch die einwöchige Behandlung mit GM-CSF dagegen steigt die zerebrovaskuläre Reaktivität wieder auf 97 % ihres Ausgangswertes an (BUSCHMANN et al., 2003). Die behandelten Tiere sind demnach also in der Lage, auf Blutflussänderungen im Rahmen der Autoregulation zu reagieren.

Wie bereits in der Etablierungsstudie dargestellt, lässt sich eine Woche nach 3-VO bei unbehandelten Tieren erst bei einer Blutdruckabsenkung auf 20 mmHg ein Hirninfarkt auslösen. In den höheren Blutdruckbereichen reicht die verbesserte Strömungssituation in Folge des arteriogen gewachsenen Durchmessers der A. cerebri posterior aus, ein Absinken des zerebralen Blutflusses unter den Schwellenwert zu verhindern. Durch die GM-CSF

Behandlung verbessert sich nicht nur die Strömungssituation, sondern auch die Reagibilität der Gefäße steigt wieder an. Demnach ist der protektive Effekt von GM-CSF in der Infarktsituation zunächst auf das aktive Anpassen des Gefäßdurchmessers an die Blutflusserniedrigung, bei stärkerer Blutdruckabsenkung rein passiv auf den großen Gefäßdurchmesser der Kollateralverbindung via A. cerebri posterior zurückzuführen.

Dies zeigen auch die Ergebnisse zur autoradiographischen CBF-Messung während Hypotension. Bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren sank der CBF im Bereich von Kortex, N. caudatus putamen und Hippocampus auf Werte unter $0,25 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ab. Bei den mit GM-CSF behandelten Tieren sank der CBF während der Hypotension zwar ab, aber er unterschied sich nicht signifikant zur Situation unter Normotension. Die Tiere mit GM-CSF Behandlung sind also in der Lage, aufgrund ihrer verbesserten Kollateralsituation und somit auch der höheren Ausgangsdurchblutung schneller und besser auf eine Stresssituation wie einen plötzlichen Blutdruckabfall zu reagieren. Die durch GM-CSF akzelerierte Arteriogenese schützt demnach bei bestehender Gefäßstenose im Falle eines hämodynamischen Schlaganfalls vor einer starken Gewebeschädigung in Folge Blutunterversorgung.

5.3.2 Ursache für erhöhte Empfindlichkeit des Hippocampus gegenüber Hypotension

Sowohl in der Evaluierung des ATP-Gehalts als auch des zerebralen Blutflusses wurden quantitative Messungen durchgeführt, um die Empfindlichkeit der verschiedenen Hirnregionen gegenüber einem hämodynamischen Schlaganfalls zu charakterisieren. Durch eine viertelstündige Hypotension von 20 mmHg kam es in der gesamten ipsilateralen Hemisphäre zu einem deutlichen Absinken des Blutflusses. Im Bereich des Kortex, versorgt von den Aa. cerebri media und posterior sowie im N. caudatus putamen und im Hippocampus lag der CBF während Hypotension bei unter $0,25 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer). Da in der Literatur ein Schwellenwert von $0,20 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für die Erhaltung des Energiestoffwechsels angegeben wird (MIES et al., 1984; PASCHEN et al., 1992), ist in diesen Bereichen mit einem starken Absinken des ATP-Gehaltes zu rechnen. Dies bestätigen auch die quantitativen ATP-Messungen. Im Bereich des parietalen Kortex und des Hippocampus sank der ATP-Gehalt unter $0,5 \mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$, im übrigen Kortex - mit Ausnahme des von der A. cerebri anterior versorgten G. cinguli - , im Bereich von N. caudatus putamen und Globus pallidus unter $1,0 \mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Vor allem der Hippocampus (CBF: $0,11 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; ATP: $0,25 \mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$) ist am stärksten betroffen. Er gehört zu den zerebralen Regionen mit hoher selektiver Vulnerabilität, so dass es nach Ischämie zum verzögerten Zelltod kommt (KIRINO, 1982; KIRINO und SANO, 1984; PULSINELLI et al., 1982). Im vorliegenden Fall ist die erhöhte Empfindlichkeit des Hippocampus auf den hämodynamischen Schlaganfall auf die anatomischen Verhältnisse der Blutversorgung zurückzuführen. Er wird von der einem longitudinal durch ihn laufenden Ast der A. cerebri posterior versorgt (PAXINOS, 1995). Es handelt sich um eine Endarterie, so dass bei Absinken des Blutflusses der Perfusionsdrucks entlang des Gefäßes stark sinkt und das distale Versorgungsgebiet nach dem Gesetz der letzten Wiese als erstes nicht mehr ausreichend versorgt wird.

Im Bereich des von der A. cerebri anterior versorgten Kortex bleibt der CBF bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren während der Hypotension im Vergleich zur Kontrollgruppe im Normalbereich ($0,81$ vs. $1,03 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Die durch die 3-VO veränderten Strömungsverhältnisse scheinen zumindest in der ersten Woche nach 3-VO keinen Einfluss auf den im Versorgungsgebiet der A. cerebri anterior liegenden Kortex zu haben. Da BUSCH et al. drei Wochen nach 3-VO auch ein arteriogenes Wachstum der A. cerebri anterior um 28 % beobachten (BUSCH et al., 2003), ist davon auszugehen, dass nach drei Wochen der

Blutfluss im Versorgungsbereich dieser Arterie ebenfalls ansteigt. Um dies nachzuweisen, wäre eine CBF-Untersuchung drei Wochen nach 3-VO notwendig.

Durch die einwöchige Behandlung mit GM-CSF wird die Arteriogenese im Bereich der zerebralen Gefäße stärker aktiviert (BUSCHMANN et al., 2003), was sich auch in den ATP- und CBF-Messungen widerspiegelte. Der CBF fiel bei mit GM-CSF behandelten Ratten während einer 20 mmHg Hypotension im Vergleich zu mit GM-CSF behandelten Tieren ohne Hypotension nicht signifikant ab. Im Kortex, im N. caudatus putamen und im Hypothalamus wurden Werte zwischen $0,75$ und $0,41 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen. Bei den mit GM-CSF behandelten Tieren sank der CBF unter Hypotension am stärksten im Bereich des Hippocampus auf $0,25 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ab, was sich auch in der quantitativen ATP-Messung widerspiegelt ($0,46 \text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Auch wenn diese Werte im Vergleich zu mit Ringerlösung behandelten Tieren etwa doppelt so hoch ausfallen, weisen sie erneut auf die besondere Anatomie der hippocampalen Blutversorgung hin (PAXINOS, 1995). Trotz seines positiven Einflusses auf die zerebrale Arteriogenese - Größenwachstum der A. cerebri posterior und rasche Wiederherstellung der zerebrovaskulären Reaktivität - und die damit verbundene verbesserte kollaterale Blutversorgung, die in den übrigen Hirnbereichen zu einer Erhaltung des Energiestoffwechsels während Hypotension führt, hat GM-CSF keinen Einfluss auf eine adäquate Blutversorgung des Hippocampus, bei dem es aufgrund des „long distance“-Effekts zum Erliegen der Energieversorgung kommt. Die gemessenen ATP-Werte in den übrigen Hirnregionen lagen bei den mit GM-CSF behandelten Tieren zwischen $1,4$ und $2,3 \text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Die Werte sind also deutlich höher als bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren, bei denen nur im Bereich vom G. cinguli, N. septalis, Thalamus und Hypothalamus höhere Werte als $1 \text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{g}^{-1}$ gemessen wurden. Da die Höhe des ATP-Gehalts die Funktionsfähigkeit der Zellen im Rahmen des Energiestoffwechsels darstellt, ist bei den mit GM-CSF behandelten Tieren nach Hypotension mit einer größeren Anzahl an intakten Neuronen mit intaktem Energiestoffwechsel zu rechnen. Inwieweit die Behandlung mit GM-CSF allerdings einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Neurone nach Schlaganfall hat, lässt sich direkt aus diesen Ergebnissen nicht sagen. Der Energiestoffwechsel der Neurone kommt bei CBF-Werten von unter $0,2 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ zum Erliegen, während der Proteinstoffwechsel nur einen CBF-Abfall von 50% toleriert (MIES et al., 1984; PASCHEN et al., 1992). Da der Proteinstoffwechsel also wesentlich empfindlicher und somit entscheidend für die Überlebensfähigkeit der Neurone ist (BODSCH et al., 1986; SHARP et al., 2000), wäre durch Messung des Proteinstoffwechsels eine Aussage über den Einfluss von Arteriogenese, akzeleriert durch GM-CSF, auf die Spätfolgen eines Schlaganfalls möglich.

5.4 Vergleich der Methoden zur Blutflussmessung

Die Messung des zerebralen Blutflusses kann mittels verschiedener Methoden durchgeführt werden. Zu einer der einfachsten Methoden zählt die transkranielle Messung mit einer Laser-Doppler-Sonde.

Der Doppler-Effekt beschreibt die scheinbare Frequenz- oder Wellenlängenveränderung einer Welle bei Relativbewegung von Quelle und Empfänger. Ein monochromatischer Laserstrahl wird über die am Schädelknochen aufgesetzte Sonde durch den Knochen bis ins Hirngewebe gestrahlt. An den in der Blutbahn zirkulierenden Erythrozyten wird das Licht reflektiert und in Richtung auf die Sonde zurückgestrahlt. Aus der Frequenzverschiebung und der Signalstärke kann der Blutfluss kalkuliert werden. Es wird also nicht der wirkliche CBF gemessen, sondern nur ein Unterschied in Bezug auf den Ausgangswert (FABRICIUS und LAURITZEN, 1996). Die genaue Kalkulation des CBF wäre mit der Laser-Doppler Methode

auch möglich, aber es wären zusätzliche Messwerte nötig: die Dicke der Schädeldecke, der Winkel zwischen Sonde und Knochen und auch die genaue Position der Sonde. Bereits durch das Versetzen der Sonde um einige Millimeter wird der gemessene Wert verändert. Um jedoch eine tendenzielle Aussage über das Verhalten des CBF während z. B. einem plötzlichen Gefäßverschluss (3-VO oder MCAO) zu erhalten, ist es eine gute und praktikable Methode. So wurde die Methode in der vorliegenden Arbeit zur Messung des Blutflussabfalls während Hypotension durchgeführt und hat relativ stabile Werte für das Absinken des ipsilateralen Blutflusses ergeben.

Eine weitere Methode zur CBF-Messung ist die ^{14}C -Jodantipyrin-Autoradiographie (SAKURADA et al., 1978). Da Jodantipyrin frei diffusibel ist und nicht metabolisiert wird, reichert es sich in Abhängigkeit von der Durchblutung in einem Organ an. Durch die Auslösung des Herzstillstandes und das sofortige Einfrieren der Tiere nach Ende der Tracerinfusion wird ein Diffundieren des IAP verhindert, und die in den jeweiligen Gefäßen vorhandene Radioaktivität spiegelt den dortigen CBF unmittelbar vor Herzstillstand wider. Somit ist die Autoradiographie eine sehr genaue Methode zur Messung des zerebralen Blutflusses. Dies wurde in dieser Arbeit auch bestätigt. Im Bereich des von der A. cerebri media versorgten Kortex lag der autoradiographisch gemessene CBF unmittelbar nach 3-VO ipsilateral bei $0,33 \pm 0,07$ und kontralateral bei $0,94 \pm 0,17 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (1 h 3-VO). Wenn man den CBF der kontralateralen Seite als Ausgangswert annimmt, wäre dies ein ipsilateraler Blutflussabfall auf etwa 38 %. Verglichen mit den gemessenen Flussabfällen von 61 % der Laser-Doppler Methode in dieser Gruppe sind die autoradiographisch gemessenen Werte deutlich geringer.

Diese Divergenz trat auch bei der CBF-Messung während Hypotension auf. Bei den mit Ringerlösung behandelten Tieren wurde während Hypotension ipsilateral ein Flussabfall auf 15 %, kontralateral auf 40 % mittels Laser-Doppler gemessen. Wenn man autoradiographisch gemessenen Werte (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / Ringer; ipsilateral: $0,20 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; kontralateral: $1,06 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) ins Verhältnis zu den Werten der Tiere sieben Tage nach 3-VO (7 d 3-VO / Ringer; ipsilateral: $0,75 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; kontralateral: $1,62 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) setzt, erhält man einen Flussabfall auf 27 % bzw. 65 %. Die beiden verschiedenen Meßmethoden ergeben für die mit Ringerlösung behandelten Tiere relativ vergleichbare Werte. Bei den mit GM-CSF behandelten Tieren trifft dies nicht zu. Die autoradiographischen Werte während Hypotension (7 d 3-VO / 15 min 20 mmHg / GM-CSF; ipsilateral: $0,62 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; kontralateral: $1,92 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) im Verhältnis zu unter Normotension (7 d 3-VO / GM-CSF; ipsilateral: $0,92 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; kontralateral: $1,14 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) ergeben deutlich höhere Werte (67 % bzw. 168 %) als die Laser-Doppler Messungen (ipsilateral: 18 %; kontralateral: 26 %). Dies bedeutet nicht, dass die Laser-Doppler Methode ungenau ist. Vielmehr ist kein direkter Vergleich der beiden Methoden möglich. Zum einen beeinflussen die Ableitebedingungen den Laser-Doppler entscheidend. Der Laserstrahl muss den Knochen und die Hirnhäute durchdringen und erreicht nur oberflächliche Schichten des Hirns. Zum anderen ist der Ausgangswert des Blutflusses mit der Laser-Doppler Methode nicht bestimmbar. Sie lässt nur eine Aussage über eine prozentuale Änderung des Flusses in Bezug auf das Ausgangsniveau zu. Somit ist Laser-Doppler Methode zwar zur qualitativen Blutflussmessung einsetzbar, es kann jedoch keine quantitative Aussage getroffen werden.

5.5 Übertragbarkeit des Modells in die Klinik

Ein hämodynamisch bedingter Schlaganfall ereignet sich oft im Zusammenhang mit einer bestehenden und sich allmählich verengenden Gefäßstenose (ADAMS et al., 1966;

GASTAUT et al., 1971; MEYER, 1958; ROMANOUL und ABRAMOVICZ, 1964). Die Gefäßverengungen können bis zu 80 % des Durchmessers betragen, bis sie zu einem Absinken des zerebralen Blutflusses unter den Schwellenwert mit nachfolgendem Schlaganfall führen. Bei geringeren Stenosen kann ein zusätzlich auftretender Faktor wie ein Abfallen des Blutdruckes oder veränderte rheologische Eigenschaften zum Unterschreiten des Schwellenwertes führen (BLADIN und CHAMBERS, 1994; BOGOUSSLAVSKY und REGLI, 1986b; FISHER und MCQUILLEN, 1981; ZÜLCH, 1961).

BUSCH et al. haben in ihrem Modell der 3-VO diese Situation in der Ratte simuliert (BUSCH et al., 2003). Durch die Okklusion der A. carotis in Kombination mit beidseitigem Verschluss der Vertebralarterien kommt es zum Absinken des CBF in der ipsilateralen Hemisphäre, wobei dieser reduzierte Blutfluss noch keinen Infarkt auslöst. Zudem zeigen die Tiere eine Woche nach 3-VO noch eine deutlich reduzierte zerebrovaskuläre Reaktivität, auch wenn sich der CBF erholt. Diese Situation ist ebenfalls beim Menschen bekannt. Bei Patienten mit Stenose der A. carotis interna ist die zerebrovaskuläre Reaktivität um 67 % reduziert, und auch bei Stenosen anderer extrakranieller Gefäße ist diese stark herabgesetzt (MARKUS und CULLINANE, 2001; MARKUS et al., 1996; RINGELSTEIN et al., 1994; WHITE und MARKUS, 1997). Das Modell der 3-VO bietet also eine gute Grundlage, um den Einfluss der Arteriogenese auf die Kollateralisierung im Gehirn bei bestehenden Gefäßstenosen zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt ereignet sich ein hämodynamischer Schlaganfall bei einem starken Absinken des lokalen zerebralen Blutflusses. Neben pathologisch auftretenden Faktoren wie Anämie, verringerte Blutviskosität oder antihypertensiver Medikation (BLADIN und CHAMBERS, 1994; BOGOUSSLAVSKY und REGLI, 1986b; FISHER und MCQUILLEN, 1981; ZÜLCH, 1961), die das Auftreten eines Schlaganfalls begünstigen können, kommen auch „physiologische Faktoren“ vor. Beim Menschen sinkt während der frühen Morgenstunden zwischen drei und fünf Uhr der arterielle Blutdruck stark ab und kann so in Kombination mit einer hämodynamisch wirksamen Stenose zur kritischen Minderperfusion des Gehirns führen (ARGENTINO et al., 1990; EIGENBRODT et al., 2000; HAAPANIEMI et al., 1992). Die im vorgestellten Modell der hypovolämischen Hypotension erreichte Blutdruckmarke von 20 mmHg unterschreitet bei weitem den beim Menschen erreichten Blutdruckabfall. Andererseits konnte aber in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die innerhalb einer Woche einsetzende Arteriogenese der Kollateralblutfluss in soweit verbessert wurde, dass der Reiz einer Blutdruckabsenkung auf 50 mmHg nicht mehr ausreichte, um einen Infarkt auszulösen. Erst ab 20 mmHg war eine ATP-Depletion zu sehen.

Ein Schwachpunkt im dargestellten Modell ist die Blutdruckmessung an sich. Es wurde eine intravasale Blutdruckmessung im Bereich der A. femoralis oder A. coccygea durchgeführt. Bei einem Blutdruck von 50 mmHg kann davon ausgegangen werden, dass der an der A. femoralis gemessene Blutdruck dem im Gehirn entspricht. Bei einer weiteren Absenkung des Blutdrucks kommt es zu einer Zentralisierung des Bluts im Bereich der lebenswichtigen Organe, zu denen auch das Gehirn zählt. Daher ist davon auszugehen, dass bei einem an der A. femoralis gemessenen Blutdruck von 20 mmHg der Blutdruck im Gehirn wesentlich höher sein wird. Um dies genauer quantifizieren zu können, wäre die Durchführung einer Versuchsreihe mit gleichzeitiger Blutdruckmessung an der A. femoralis sowie an der A. carotis sinnvoll.

Da bei allen Tieren der vorliegenden Arbeit der Blutdruck an der A. femoralis oder A. coccygea gemessen wurde und somit der Effekt auf die zerebrale Blutversorgung gleich war, kann das dargestellte Modell als geeignet angesehen werden, um die Auswirkungen einer Stenose der extrakraniellen Hirngefäße im Rahmen eines hämodynamischen Schlaganfalls zu untersuchen, auch wenn der tatsächlich erreichte Blutdruck im Gehirn nicht bekannt ist.