

## 1. Zusammenfassung

Der akute Verschluss einer hirnversorgenden Arterie verursacht eine verminderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der abhängigen Hirnareale – der ischämische Schlaganfall. Unterschreitet die Minderversorgung den kritischen Wert von 0.05 ml/g (Hirn)/min, kommt es bereits nach 10 Minuten neben dem Funktionsausfall mit neurologischen Symptomen zu einem irreversiblen Untergang von Hirngewebe im betroffenen Hirnareal. Im Bereich der ischämischen Penumbra mit einer Durchblutung von 0.23 ml/g/min kann die schnelle Wiedereröffnung des Gefäßes mit resultierender Reperfusion nicht nur den Funktionsverlust beseitigen, sondern auch den sekundären Nervenzelluntergang verhindern. Die Thrombolyse ist somit die kausale und bislang einzige evidenzbasierte Therapie des ischämischen Schlaganfalls. Sowohl Reperfusion als auch das irreversibel geschädigte Hirngewebe selbst führen allerdings zu sekundären Veränderungen im Gehirn, u.a. in der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Diese sind z.B. für die Entstehung des Hirnödems und der Reperusionsblutung sowie der sekundären Toxizität verantwortlich. Die Permeabilität der BHS folgt dabei einem zeitlich bi-phasischen Muster, welches durch die metabolisch-toxische Schädigung des Gefäßendothels, durch Aktivierung der Entzündungskaskade, aber auch durch regenerative Mechanismen induziert wird. Die Änderungen in der Permeabilität der BHS lassen sich in-vivo über die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Gabe von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel (Gd-KM) nachweisen. Darüber hinaus erlaubt die MRT eine Quantifizierung des intrazerebralen Ödems über die Messung des Wassergehalts. In dieser Arbeit wird das bi-phasische Muster der BHS-Permeabilität für Gd-KM bei experimenteller reversibler zerebraler Ischämie bei Ratten durch serielle MRT

untersucht und in Beziehung zum parallel gemessenen sich entwickelnden Hirnödems gesetzt. Dabei wurde ein klinisches 3T- MRT mit Standardsequenzen für Menschen und nur mit kleinen Modifikationen aufgrund des signifikant kleineren Rattengehirns benutzt.

In dieser Studie wurden insgesamt 17 Ratten benutzt, die in zwei Gruppen unterteilt wurden. In der experimentellen Gruppe mit 90-minütiger Fadenokklusion der A. cerebri media (MCAO) wurden 11 Tiere, in der sham-operierten Gruppe wurden 6 Tiere ausgewertet. Die MRT der experimentellen Gruppe erfolgte zu sechs Zeitpunkten: Vor der Ischämie, 1 Stunde nach der Ischämie, direkt nach Reperfusion sowie 4, 24, 48 Stunden nach der Reperfusion (04PR, 24PR, 48PR). Die Sham-Gruppe wurde nur an den drei letzten Zeitpunkten untersucht. Es wurden folgende Sequenzen durchgeführt: DW-EPI, T<sub>2</sub>-TSE, T<sub>2</sub>- Relaxationzeitbestimmung, prä- und post-Gd-KM T<sub>1</sub>-SE – letztere nur an den Zeitpunkten 04PR, 24PR und 48PR. Die biphasische BHS-Öffnung stellte sich durch Erniedrigung der Intensität des Signals im infarzierten Hirnareal 24PR im Vergleich zu 04PR und 48PR in den Gd-KM T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern dar. Parallel dazu zeigte sich in den T<sub>2</sub>-gewichteten Sequenzen ein kontinuierlicher Anstieg des Ödems mit einem Maximum bei 24PR (gemessen in der T<sub>2</sub>-Relaxometrie) an.

Die unterschiedliche Zeitkinetik für Kontrastmittelübertritt und Ödementwicklung deutet an, dass für die Ödementwicklung die BHS-Permeabilitätsveränderung nicht allein ausschlaggebend ist. Kleine Moleküle wie Ionen scheinen weiterhin die BHS zu überqueren und ihren Beitrag für die Ödembildung zu leisten. Die Untersuchung der Permeabilität der BHS nach Ischämie könnte helfen, effektivere Therapien nach Thrombolyse zu entwickeln und insbesondere ihren Einfluss auf die Ödementwicklung frühzeitig zu charakterisieren.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Die Blut-Hirn-Schranke**

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) ist nicht nur das wichtigste sondern auch das sensibelste Organ im menschlichen Organismus. Das ZNS toleriert nur sehr kleine Veränderungen im Bereich des Ionen-, Protein- und Energiehaushaltes, um seine Funktion aufrecht zu erhalten. Dabei wird der Blut-Hirn-Schranke (BHS), eine Barriere zwischen dem Hirngewebe und dem Intravasalraum, (Lewandowsky et al., 1900) eine besondere Bedeutung zugeordnet (Ehrlich et al., 1885; Goldmann et al., 1913). Obwohl die Funktion der BHS seit langem bekannt ist, sind die Mechanismen, die ihre multiple Funktion vor allem in nicht-physiologischen Phasen beeinflussen, nicht ausreichend geklärt.

Die BHS in-vivo wird durch das zerebrale Endothel mit ihren engen Zell-Zell-Verbindungen, sog. tight-junctions (TJ), und durch eine hohe Polarität der endothelständigen Transporter, sowie einem hohen transendothelialen elektrischen Widerstand gebildet. Induziert werden diese endothelialen Barriereigenschaften über die Interaktion des Endothels mit insbesondere den Astrozytenfortsätzen (Haseloff et al., 2005), Perizyten (Sedlakova et al., 1999), Neuronen und der extrazellulären Matrix. Dieser neuroendokrine „crosstalk“ wurde erstmals durch die Arbeiten von Stewart und Wiley beschrieben (Stewart und Wiley et al., 1981). Auf diesem Konzept der BHS basiert auch die komplexe Antwort in pathologischer Situation, welche auch als ‚neurovaskuläre Einheit‘ beschrieben wird (Hawkins et al., 2005). So beschreibt die neurovaskuläre Einheit, dass Veränderungen von z.B. Neuronen oder Astrozyten zu Veränderungen an der BHS führen können.

### 2.1.1. Das Endothel

Die Endothelzellen, die die BHS in-vivo bilden, unterscheiden sich von den restlichen Endothelzellen des Körpers durch eine verminderte Pinozytoseaktivität, einen höheren Mitochondriengehalt (Oldendorf et al., 1977), einen Mangel an transendothelialen Kanälen und das Fehlen von Fenestrations (Fenstermacher et al., 1988).

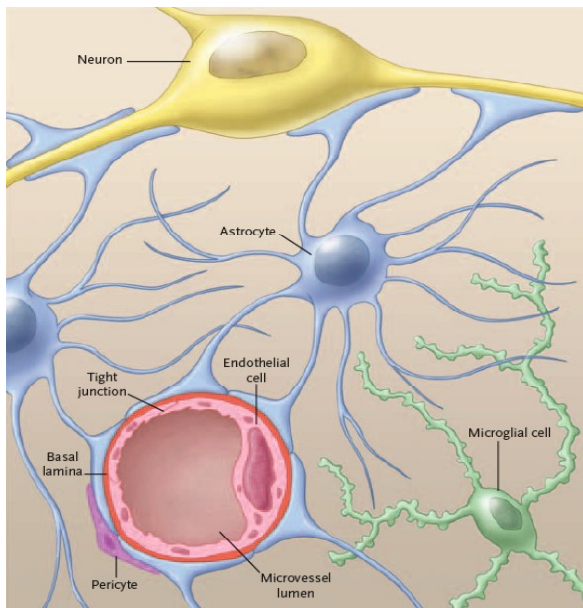


Abb.1:Die Blut-Hirn-Schranke in der neurovaskulären Einheit: Neurone, Mikroglia, Perizyten induzieren die charakteristische Barrierefunktion der Endothelzellen. 'Tight junctions' verhindern den parazellulären Transport und der hohe elektrische Widerstand lässt fast keine transzelluläre Diffusion zu. Perizyten liegen der Basalmembran bzw. der abluminalen Zellmembran an. Endothelzellen und Perizyten werden nahezu vollständig von Astrozyten-Endfüßen umgeben, die die 'glia limitans perivascularis' bilden. Zusätzlich haben neuronale Fortsätze engen Kontakt zu der abluminalen Membran der Endothelzellen. (Aus del Zoppo et al., 2006)

Zusätzlich zu der verminderten Zahl an transendothelialen Kanälen sind die tight-junctions (TJ) für den allenfalls geringen unselektierten para-endothelialen Einstrom von Substanzen verantwortlich. Die eingeschränkte Permeabilität der BHS führt zu einer nahezu konstanten Ionen- und Proteinkonzentration im Hirngewebe, was die optimalen extravasalen Bedingungen für die Funktion der Nervenzellen gewährleistet. Das Endothelium der Kapillaren im Gehirn reguliert den Austausch von Aminosäuren, den Transport von Ionen durch den  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{Cl}^-$  Co-Transporter, der  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ - Pumpe, den Influx von  $\text{K}^+$  durch die  $\text{K}^+$ -Kanäle, wie auch die Aufnahme von Glukose, Fettsäuren und anderen Stoffen aus dem Plasma (Pardridge et al., 1998). Die Zellmembran und der hohe transepitheliale Widerstand beschränken die passive

trans-endotheliale Diffusion durch die BHS. Diese ist im Prinzip von der Molekülgröße und von der Lipophilie der Substanzen abhängig. Studien haben gezeigt, dass Moleküle mit Radius bis 1,2 nm und einem Molekulargewicht von maximal etwa 5 kDa die Plasmamembran passiv überwinden können (Saunders et al., 1999). Da allerdings die Plasmahalbwertszeit der kleinen Moleküle im Plasma sehr kurz ist, gelangen diese nur in geringem Maße auch in das ZNS.

### **2.1.2. Tight junctions – spezielle Zell-Zell-Kontakte**

Den tight-junctions (TJ) wird die hauptsächliche Barrierefunktion zugeschrieben (Kniesel et al., 2000). Sie limitieren die para-endotheliale Diffusion, während die trans-endotheliale Diffusion durch den hohen TEER, fehlende Pinozytose und selektive endothelständige Transporter gewährleistet wird. Die TJ befinden sich vor allem am apikalen Pol der Epithel- und Endothelzellen. Sie trennen die Zellmembran des Endothels in einen apikalen und einen basolateralen Teil. Drei Proteinfamilien sind im Wesentlichen am Aufbau der TJ beteiligt - Claudine, Occludine und die junction adhesion molecules (JAMs). Diese bilden die apikale parazelluläre Verbindung. Die Claudine sind Proteine mit vier Transmembrandomänen, die integrale Bestandteile der TJ- Stränge sind (Furuse et al. 1998). Claudine interagieren entweder mit dem gleichartigen Partner der benachbarten Zelle oder treten interzellulär in Verbindung mit den Zonula Occludens Proteinen (ZO-1; ZO-2; ZO-3) und Plasmamembranproteinen des Zytoskeletts in Kontakt (Itoh et al., 1999). Die ZO sind dem entsprechend intrazellulär in der Nähe der TJs lokalisiert. Sie gehören zu der Familie der MAGUKs (membrane associated guanylate kinases). Occludin-Proteine besitzen vier Transmembrandomänen. Sie binden intrazellulär an die ZO-1 und ZO-2 (Itoh et al., 1999). Das Zusammenspiel der Occludine und der

TJs hat eine verstärkende Barrierefunktion mit Einschränkung der para-endothelialen Permeabilität zur Folge (Hirase et al., 1997). Die Gruppe der JAM-Proteine hat bislang drei gut charakterisierte Vertreter. Das JAM-1 ist ein Mitglied der IgG-Superfamilie (Dejana et al., 2000), die anderen zwei JAM-2 und JAM-3 sind im Endothel und in dem lymphatischen Gewebe, aber nicht im Epithel zu finden.

Die TJ-Proteine werden in ihrer Funktion durch verschiedene Mechanismen reguliert. Einer davon ist die intra- und extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Als ein wichtiger intrazellulärer Mediator wird die Zellfunktion durch jede Entgleisung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst, was u.a. auch einen Einfluss auf die Funktion der ZO-Proteine und damit auf die Stabilität der TJ hat. Das wird nicht nur direkt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, sondern auch durch die verschiedenen Kinasen und Proteasen bewirkt, die selber durch Kalzium in ihrer Funktion beeinflusst werden (Andreeva et al., 2000).

### **2.1.3. Die Astrozyten**

Astrozyten spielen im Sinne des neurovaskulären Crosstalks eine besondere Rolle bei der Bildung der BHS. Sie machen zudem ca. 50% der Zellen des ZNS aus und gehören zu dem Nervengliedgewebe, den sogenannten Gliazellen. Sie haben fußartige Ausläufer, die an der basolateralen Seite der Endothelzellen - durch die Basalmembran getrennt - in Kontakt treten und diese fast vollständig umhüllen. Diese bilden die sog. Glia limitans, auch gerne als äußere Blut-Hirn-Schranke bezeichnet. Es gibt Hinweise dafür, dass Astrozyten eine Rolle bei der neuronalen Übermittlung von Signalen spielen, aber auch die Permeabilität der Mikrogefäße beeinflussen (Ballabh et al., 2004). Eine neuronale Aktivierung scheint eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$  in den die Hirnkapillaren umgebenden Astrozyten zu induzieren, was zu einer Dilatation der präkapillären Arterien führt (Zonta et al., 2003).

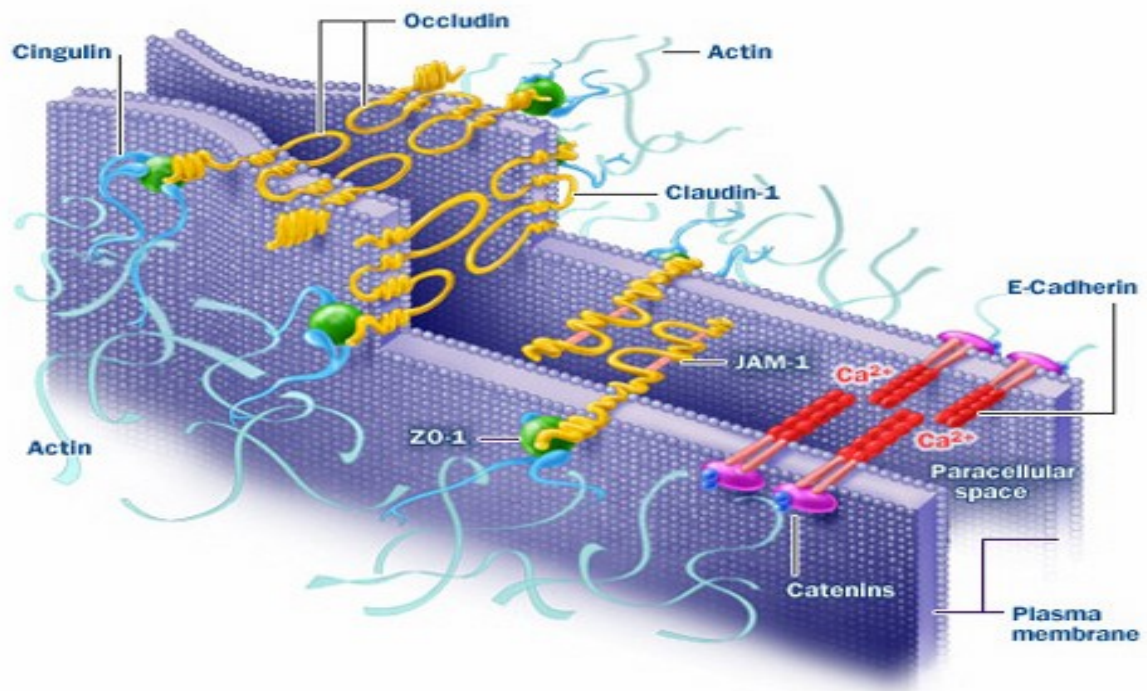


Abb.2: Die Abbildung zeigt die Struktur und die Lokalisation der Proteine, die an den Zell-Zell-Kontakten teilnehmen.

Die Astrozyten sorgen zudem für ein konstantes Ionenmilieu im Hirngewebe. Für die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden mehrere Mechanismen beschrieben. Die Astrozytenfüßchen sind reichlich mit  $\text{K}^+$ -Kanälen ausgestattet, was eine Kontrolle der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration erlaubt und so für ein optimales Ionenmilieu sorgt.

#### 2.1.4. Die Perizyten und die extrazelluläre Matrix

Perizyten (PC) sind Zellen, die ubiquitär auf den Kapillaren, Venolen und Arteriolen zu finden sind und von ausgewanderten Makrophagen abstammen. Durch die Expressierung von verschiedenen Rezeptoren scheinen sie eine Rolle bei der Autoregulation der Gefäße zu spielen (Hellstrom et al., 2001; Elfont et al., 1989). Es

wird ihnen eine Rolle bei der Angiogenese und der Entwicklung der BHS zugeschrieben (Balabanov et al., 1998; Hirschi et al., 1997).

Die Basalmembran befindet sich zwischen den Astrozytenfortsätzen und den Endothelzellen. So bildet sie ein Grundgerüst für die Mikrogefäße und spielt eine Rolle beim Überleben, dem Wachstum und der Integrität der Gefäßendothelzellen. Die extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich aus Typ IV-Kollagen, Laminin und Fibronectin gebildet. Diese Moleküle haben haftende Eigenschaften, die die Funktion der Basalmembran prägen. Die so vermittelten Kontakte zwischen den Astrozytenfortsätzen und den Endothelzellen sind existenziell für die Bildung der BHS und für den Erhalt ihrer Funktion.

Die Überlegung, dass alle diese Strukturen an der Bildung der neurovaskulären Einheit teilnehmen, vereinfacht das Verständnis der Mechanismen, die unter pathophysiologischen Bedingungen wie Ischämie, Hypoxie und Entzündung stattfinden.

## **2.2. Der akute ischämische Schlaganfall**

### **2.2.1. Epidemiologie und Ätiologie**

Der Schlaganfall ist Hauptursache für bleibende Behinderung und belegt den dritten Platz bei den häufigsten Todesursachen in Deutschland und in den Vereinigten Staaten (Statistisches Bundesamt 2003; NCHSS Sterbestatistik) (Wolf, 1992). Mit 87% (GCNKSS, NINDS 1999) nimmt der ischämische Schlaganfall, also der Hirninfarkt, eine Hauptrolle ein. Die häufigsten Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall sind die kardiogene Embolie und die arteriosklerotischen Veränderungen der hirnversorgenden Gefäße. Das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, nimmt zwar mit dem Alter zu. Jedoch sind  $\frac{1}{4}$  aller Schlaganfallpatienten

unter 65 Jahre alt, so dass diese Patienten lange mit den Folgen des Schlaganfalls überleben können bzw. leben müssen.

### **2.2.2 Therapie des akuten ischämischen Schlaganfalls und die Penumbra**

Die schnelle Revaskularisation mittels rekombinantem gewebstypischem Plasminogenaktivator (rt-PA) ist eine der wenigen etablierten und evidenzbasierten Therapien beim Schlaganfall. Mehrere große randomisierte doppelgeblindete Studien zeigten, dass eine Revaskularisation bis zu max. 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik zu einer signifikanten Besserung des klinischen Outcomes des Patienten führt (ECASS-Studien, NINDS-Studie), wobei die Erfolgsaussichten auf restitutio ad integrum mit der Zeit in diesem Lysezeitfenster abnimmt (Hacke et. al. ECASS-III). Die intravenöse (i.v.) Lysetherapie hat sehr strikte Indikationen und vor allem multiple Kontraindikationen, um Komplikationen zu minimieren. Die wichtigste und gefährlichste Komplikation ist die symptomatische intrazerebrale Einblutung (in ECASS III als „significant symptomatic hemorrhage type II“ klassifiziert). Zuletzt zeigte die ECASS III Studie, wenn man innerhalb von max. 4,5 Stunden nach dem Symptombeginn mit der Therapie beginnt, man bei einem von 14 Patienten mit einer restitutio ad integrum ohne Erhöhung des Blutungsrisiko rechnen kann (Hacke et al., 2008). Die Komplikation einer Hirnblutung tritt weiterhin bei einem von 38 Patienten auf (Saver et al., 2009).

Die Lysetherapie basiert darauf, dass nicht alle Hirnzellen bei einem akuten Gefäßverschluss sofort absterben, sondern noch strukturerhaltend, aber nicht funktionserhaltend versorgt werden - das Prinzip der „ischämischen Penumbra“. In anderen Worten ist die Penumbra (Latein: „Halbschatten“) das Gewebe, das das Infarktzentrum umgibt und nicht mehr suffizient perfundiert wird, aber durch Diffusion

von perfundiertem Gewebe in der Umgebung vor allem Sauerstoff und Glukose erhält (siehe Abb. 3). In der ischämischen Penumbra beträgt die Hirnperfusion unter 0.23 ml/g (Hirn)/min– es kommt zum Funktionsausfall– aber nicht unter 0.05 ml/g (Hirn)/min, der kritischen Schwelle, bei dem Hirngewebe irreversibel geschädigt wird. Dieses Gewebe, auch „tissue at risk“ genannt, kann nach Reperfusion seine Funktion wieder aufnehmen und ist die pathophysiologische Rationale der Lysetherapie. Als bildgebendes Korrelat wird das ‚mismatch‘ zwischen den Perfusions- und Diffusionssequenzen in der MRT angesehen.

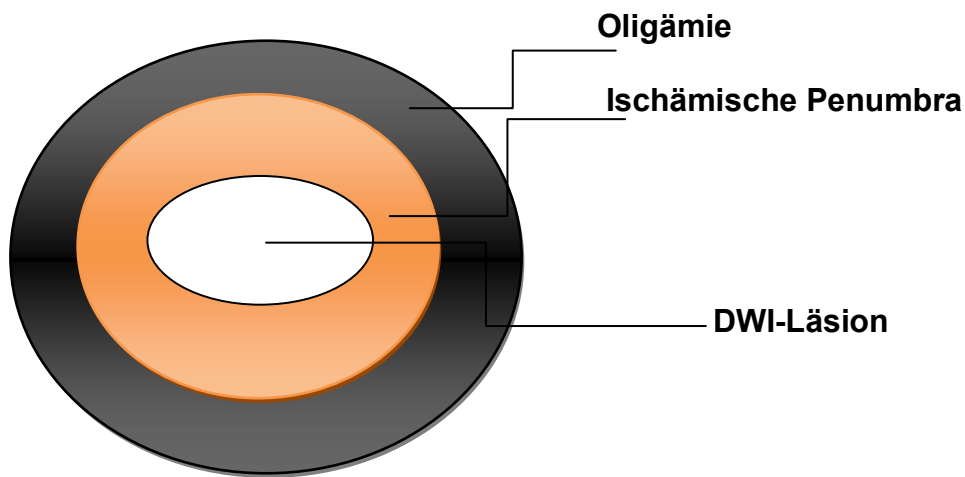


Abb. 3: Schematisierte Darstellung der Penumbra: In schwarz ist das normal durchblutete Gewebe. In Orange ist das Gewebe, was nicht mehr durchblutet ist, aber durch Diffusion noch seine Struktur hält, im Weiß ist der Infarktkern: gestörte Diffusion und Durchblutung. Die Differenz zwischen Orange plus Weiß minus Weiß ist die Penumbra ('tissue at risk').

### 2.3 Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nach akuter zerebraler Ischämie

Nach der Wiedereröffnung, z.B. durch die i.v. Thrombolyse mit rt-PA oder auch neurovaskulären Interventionen (z.B. Merci®-retriever, Penumbra® device oder retrahierbarem Solitaire®-Stent), kann es neben der Änderung der BHS-Permeabilität zu weiteren Störungen zerebraler Funktionen kommen, z.B. durch Hirnödembildung oder Inflammation mit ggf. weiterem Untergang von Hirngewebe. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind Exzitotoxizität, Freisetzung von freien

Radikalen, Inflammation und Apoptose. In dem folgenden Kapitel wird auf die Entstehung des zytotoxischen und vasogenen Ödems und den Verlust der BHS-Funktion überblickend eingegangen.

### **2.3.1 Das vasogene Ödem**

Das Verhalten der BHS unter Ischämie wurde in mehreren in-vivo und in-vitro Studien mit Fokus auf die Funktion und Morphologie der TJ erforscht. Da alle eine gesteigerte Permeabilität der BHS zeigten, nahm man an, dass der para-endotheliale Flux durch die gestörten TJs Hauptursache für die vasogene Ödembildung sei: Flüssigkeit tritt gemäß dem osmotischen Gefälle bzw. folgt osmotisch aktiven Substanzen wie Albumin aus dem Intravasal- in den Extravasalraum bzw. dem Hirngewebe. Das vasogene Ödem ist vor allem für die raumfordernde Wirkung eines großen ischämischen Hirninfarkts verantwortlich, welche die gefährlichste Komplikation über die temporale Herniation die häufigste Todesursache in der frühen Phase nach dem Schlaganfall darstellt. Für diesen Austritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen in den Extravasalraum sind mehrere Mechanismen in Betracht zu ziehen, die zeitlich getrennt von einander ablaufen. Schon in den ersten Minuten nach Beginn der Ischämie wird die Expression der hypoxia inducible factor-1a' (HIF-1a) stimuliert. Der HIF-1a aktiviert u.a. die Expression des ‚vascular endothelial growth factors' (VEGF) (Semenza et al., 2004) und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS). VEGF ist bekannt für seine Funktion als Angiogenese-Aktivator. Er erlangte als Permeabilitätsfaktor mit Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit nicht nur im ZNS, sondern auch bei der Tumorgenese eine wesentliche Bedeutung. Im ZNS wird VEGF von mehreren Zellpopulationen wie Astrozyten, Mikroglia, Neuronen, Perizyten und anderen exprimiert (Abumiya et al.,

1999). Durch seine gesteigerte Aktivität werden Veränderungen in der Funktionalität der interendothelialen Verbindungen, Kontinuität des Endothels und Degeneration der Basalmembran verursacht (Dobrogowska et al., 1998). VEGF kann selbst eine Lockerung der TJ-Kontakte und eine direkte oder indirekte Aktivierung der endothelialen NOS induzieren. Die NOS synthetisiert Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin. Ihre Funktion wird durch hohe intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen beeinflusst. NO bewirkt eine Dilatation der Gefäße und so steigert es auch den zerebralen Blutfluss (CBF).

Die Matrixmetalloproteasen (MMP) gehören ebenfalls zu den Enzymen, die unter Ischämie/Hypoxie ihre Aktivität steigern bzw. hochreguliert werden. MMPs gehören zur großen Familie von zinkabhängigen Proteasen. An der BHS sind vor allem MMP-2 und MMP-9, auch Gelatinase A und Gelatinase B genannt, interessant, weil sie die endotheliale Basalmembran und andere Strukturen der extrazellulären Matrix (EZM) angreifen und so die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen. Auch sind die MMPs in hohem Maße für die symptomatischen Blutungen nach Thrombolyse, sei es endogen (=spontan) oder nach rtPA- Gabe, verantwortlich. Die proteolytische Wirkung der MMPs wurde in mehreren Studien erforscht. Sie stimmen darin überein, dass die MMP-2 und MMP-9 eine höhere Affinität zu Kollagen Typ IV in der Basalmembran haben und diese degradieren (Yang et al., 2007). In mehreren Studien zeigte die Gruppe um G. Rosenberg, dass die zwei Gelatinasen zeitlich getrennt voneinander ihre Aktivitätsspitzen erreichen. Die erste Erhöhung der MMP-2 (Gelatinase A) scheint 3 Stunden nach Reperfusion zu erfolgen, die erste deutliche Erhöhung der MMP-9 (Gelatinase B) liegt bei ca. 48 Stunden nach Reperfusion. Diese zwei Ergebnisse korrelierten mit den zwei Zeitpunkten, in denen der Austritt von Saccharose als intravasales Kontrastmittel in den Extravasalraum gesteigert war.

Saccharose wird häufig in Experimenten als Marker für die Permeabilität der BHS benutzt. Begleitend wurde eine kontinuierliche Zunahme des Wassergehalts im Hirngewebe festgestellt. Diese Ergebnisse können ein Hinweis sein, dass die MMPs eine Rolle bei der Modellierung der bi-phasischen BHS- Eröffnung spielen.

### **2.3.2 Das zytotoxische Hirnödem**

Dem vasogenen Ödem steht das zytotoxische Ödem bei der Entstehung raumfordernder ischämischer Infarkte gegenüber und tritt signifikant früher auf. Ein Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) führt zum Versagen des intrazellulären Ionengradienten. Die wichtigste ATP-abhängige Ionen-Pumpe an der Zellmembran ist die Na/K-ATPase. Die Reduktion ihrer Funktion führt zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle und Ausfluss aus der Zelle. Das verursacht eine Verschiebung der Konzentrationen der Ionen in der Zelle und gleichzeitige Depolarisierung der Zellmembran. Die Aufnahme von  $\text{Na}^+$  wird vom Einströmen des Wassers in die Zelle begleitet, was eine Schwellung der Zelle hervorruft. Diese Depolarisation führt zu einer postsynaptischen Ausschüttung von Glutamat und anderen exzitatorischen Aminosäuren in dem Extrazellulärraum. Glutamat aktiviert die N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren, was zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  führt.

Um den Mangel an ATP zu beheben, steigert die Zelle die anaerobe Glykolyse, was eine Anhäufung an Laktat in der Zelle verursacht. Die so entstandene intrazelluläre Laktatazidose führt zur Bildung eines osmotisch wirksamen Gradienten, der eine weitere Wasserverschiebung in die Zelle über verschiedene Antiporter und Symporter induziert (Ringel et al., 2000). Die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch mehrere Kanäle kontrolliert.  $\text{Ca}^{2+}$  ist ein wichtiger intrazellulärer Mediator, der mehrere Enzyme, wie Proteasen, Phospholipasen, Endonukleasen oder NO-

Synthetasen beeinflusst. Diese bewirken Schädigungen der Zellmembran, des Zellkerns oder anderer Organellen.

Die gesteigerte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt nicht nur zur Aktivierung von Enzymen, sondern auch zur Produktion freier (Sauerstoff-)Radikale. Unter physiologischen Bedingungen werden solche freie Radikale in kleineren Mengen gebildet und auch schnell eliminiert. Die Elimination erfolgt durch verschiedene Enzyme wie Superoxid- Dismutasen, Katalasen u.a. Unter Ischämie verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der freien Radikale. Das führt zu Schädigung von DNA, Proteinen, Nukleinsäuren und Membranen, was u.a. zur Störung der BHS beiträgt und teilweise die Einleitung der Apoptose zu Folge hat.

Das zytotoxische Hirnödem selbst hat keine raumfordernde Wirkung, da es sich um eine nur um Verschiebung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens in die Nervenzelle handelt. Erst das später einsetzende vasogene Ödem führt zur raumfordernden Wirkung. Die verschiedenen Zellen der neurovaskulären Einheit (Astrozyten, Endothel, Neurone, Mikroglia, Perizyten) schwellen nicht gleichzeitig. Ein großer Teil der Zellen ist nach 30 min bis 1 Stunde nach Okklusion / Hypoxie geschwollen (Dodson et al., 1977; Garcia et al., 1995; Pantoni et al., 1996;). Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen sind die sensibelsten und reagieren am schnellsten.

### **2.3.3 Die bi- phasische BHS- Öffnung in Tierexperimenten**

Die Permeabilitätsänderung der BHS nach experimenteller Ischämie mit und ohne Reperfusion konnte im Nagetier in vielen Studien gezeigt werden. Dabei wurden verschiedene Markermoleküle angewendet, die sich primär im Intravasalraum verteilen. Erst eine BHS-Störung führt zur Anreicherung dieser Moleküle im Gehirn,

die unterschiedliche Molekülgrößen, unterschiedliche Bindungsaffinitäten und auch verschiedene Ladungen und verschiedene Nachweisverfahren hatten. Es zeigte sich, dass die Permeabilität für diese Makromoleküle insbesondere nach Ischämie/Reperfusion ein zeitlich durchaus dynamischer Prozess zu sein scheint (Abraham et al., 2002; Ballabh et al., 2004; Belayev et al., 1996; Kuroiwa et al., 1985). Aufgrund der unterschiedlichen Studienprotokolle kann man über die Sensitivität und Spezifität dieser Studien diskutieren. Gemeinsam war jedoch, dass diese Studien einen bi-phasischen (nimmt man das Momentum der initialen Reperfusion dazu gar tri-phasischen) Verlauf der Permeabilität der BHS zeigten. Diese war allerdings von einer nicht unerheblichen Varianz geprägt, die aus der Tatsache herrührt, dass Schlaganfallexperimente häufig zu variablen Infarkten führten und die Messung der BHS Permeabilität eine finale Untersuchung des Tiers ist. Darüber hinaus ist durch die herkömmlichen histologischen Methoden eine parallele Untersuchung des Hirnödems nicht möglich. Hier liegen entscheidende Vorteile der MRT, mit der sich beide Phänomene, Kontrastmittelübertritt und Ödementwicklung, parallel und in demselben Tier seriell untersuchen lassen. Aufgrund von der signifikant kleineren Größe des Gehirns eines Nagetiers werden teure Magnetresonanztomographen mit hoher Magnetfeldstärke verwendet, die aber nur eingeschränkt zu Verfügung stehen.

#### **2.4 Physikalische Grundlagen der Magnetresonanztomographie**

Die Kernspintomographie (MRT) ist der zerebralen Computertomographie (cCT) in der akuten Phase aufgrund der Diffusionssequenzen in der Beurteilung von Infarktgröße und Lokalisation überlegen. Eine Diffusionsstörung liegt vor, wenn die Brown'sche Molekularbewegung – Moleküle bewegen sich nahezu ungehindert im

Extrazellulärtraum des Gehirns in alle Richtungen – eingeschränkt ist. Die Entwicklung des zytotoxischen Ödems mit Verschiebung der Extrazellulärflüssigkeit in das geschädigte Neuron oder den Astrozyten (nach intrazellulär) bildet die pathophysiologische Grundlage für diese Technik.

Die physikalische Grundlage für die MRT besteht in der Eigenrotation der Protonen (Spin). Die Drehung der Protonen um die eigene Achse verursacht ein magnetisches Moment. Im natürlichen Gewebe zeigen diese Spins in verschiedene Richtungen, d.h. sind willkürlich ausgerichtet (bzw. allenfalls am natürlichen Erdmagnetfeld). Wenn sie sich in dem starken homogenen Magnetfeld des Kernspintomograph (MRT) befinden, werden sie parallel oder antiparallel zu dem Magnetfeld ausgerichtet d.h. polarisiert. Während der Untersuchung wird von dem MRT ein hochfrequenter Radiopuls (HF) gesendet, der ein Umklappen von der longitudinalen in die transversale Magnetisierung verursacht. So erreichen die Protonen ein energetisch höheres Niveau. Da die Protonen nach dem hochfrequenten Impuls langsam die Energie abgeben, kehren sie in die longitudinale Magnetisierung zurück. Diese ausgestrahlte Energie wird durch die Spulen des MRT empfangen.

Für die Rückkehr von der transversalen zu der longitudinalen Magnetisierung haben die Spins zwei unabhängige Mechanismen zu Verfügung. Sie können die Energie an das umgebende Molekülgitter abgeben. Das wird als T1- oder Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Durch diesen Vorgang kippen die Spins in die longitudinale Ebene zurück. Der andere Mechanismus stellt die T2- oder Spin – Spin Relaxation dar. Bei ihr wird die Energie der Spins an die benachbarten Spins abgegeben. Solange sich die Spins in der transversalen Ebene befinden, drehen sie sich um die Achse des äußeren Magnets mit einer Frequenz, die von der Stärke des Magnetfeldes abhängt (Präzession). Diese Spins zeigen gleichzeitig in dieselbe Richtung, sind in Phase.

Nach dem HF- Puls dephasieren die Spins, das führt zu Abnahme des durch die Präzession verursachten Signals.

Während jeder MRT- Untersuchung entstehen durch das Körpergewebe, endogene oder exogene Faktoren messbare Inhomogenitäten in dem äußeren Magnetfeld. Solche Faktoren können auch Kontrastmittel, desoxygeniertes Hämoglobin und andere sein. Diese Inhomogenitäten führen zu einem schnelleren Verlust der Phasenkohärenz und so zu einer Verkürzung der T2\*-Relaxation.

Um diese Signale genau orten zu können, werden Gradientenmagnetfelder eingeschaltet. Sie haben in jeder der drei räumlichen Richtungen abnehmende Magnetstärke. Das führt zu einer Differenz in der Präzessionsfrequenz der Spins an den verschiedenen Orten des Körpers. Die Bearbeitung erfolgt mit Hilfe der mathematischen Funktion (Fourier-Transformation).

#### **2.4.1 T2- und T2\*- gewichtete Sequenzen**

Wie vorher schon erwähnt, nutzen die T2- gewichtete Sequenzen das Phänomen der Spin-Spin-Relaxation. Initial werden die Spins durch einen eingestrahlten HF aus einer parallel zu dem Magnetfeld auf 90° Grad transversal zu dem Magnetfeld Spinrichtung ausgelenkt.

Bei weiteren Sequenzen für verschiedene Fragestellungen, die als Grundlage die T2-Relaxationszeit nutzen, werden zu verschiedene Zeitabständen Hochfrequenzimpulsen eingeschaltet, wie zum Beispiel in dieser Arbeit die Turbo-Spinecho (TSE) und T2\*- oder Gradienten Echo (GE). Die TSE unterscheiden sich beispielsweise von der T2-Grundsequenz durch Fehlen von einem 180° Grad gerichteten Impuls. Anstatt diesem sind mehrere 90°Grad gerichtete HF eingeschaltet. Diese Veränderung führt zu einer kürzeren Untersuchungszeit und

besserem Kontrast der Bilder. Bei den T2\*- (GE) Sequenzen hingegen fehlt der 180°-Grad HF. Dieser wird in den T2- gewichteten Sequenzen für die Kompensation störender Rephasierungseffekte lokaler Suszeptibilitätsunterschiede benutzt. Die räumliche Kodierung der erzeugten Anregungen und der gewonnenen Signale als Voraussetzung der Entstehung von Schnittbildern erfolgt mit zusätzlichen temporär geschalteten Magnetfeldgradienten in drei Raumrichtungen. Für diese Arbeit ist diese Sequenz aus diesem Grund wichtig, weil sie sehr für Suszeptibilitätseffekte anfällig ist. Bei einem Austritt von Hämoglobin in dem Parenchym findet eine Umwandlung von Oxyhämoglobin in Desoxyhämoglobin statt und so wird Hämoglobin zu einem paramagnetischen Molekül umgewandelt. So wird ein Suszeptibilitätseffekt verursacht. Dieser stellt sich als Hypointensität (dunkel) dar.

Trotz vieler Arbeiten, die MRT als bildgebende Untersuchung nutzen, wurden noch keine Normwerte für die Intensität des gesunden und auch kranken Hirngewebes bestimmt. Um einen solchen Wert zu errechnen, werden innerhalb jeder Studie mehrere Messungen mit verschiedenen TE an verschiedenen Geweben und Tieren durchgeführt. So entsteht eine Übersicht der T2- Relaxationszeiten (sog. map). Diese zeigt eine Entwicklung der Durchschnittswerte und diese Quantifizierung erlaubt einen Vergleich zwischen den Intensitätswerten verschiedener Gewebsarten bzw. deren pathologischen Veränderungen.

#### **2.4.2 Diffusionswichtung (dwi)**

Wie eingangs erwähnt, ist die Brown'sche Molekularbewegung, die die nahezu willkürliche thermische Bewegung der Moleküle von Regionen mit höherer Konzentration zu Regionen mit niedrigerer Konzentration beschreibt, Grundlage der diffusions-gewichteten MR-Sequenzen. Die freie Beweglichkeit ist allerdings in

biologischen Geweben aufgrund des Vorhandenseins von semipermeablen Membranen und Organellen eingeschränkt. So entsteht eine gerichtete Bewegung, die als Anisotropie bezeichnet wird. Aufgrund dieser Anisotropie werden die Messungen in drei Raumrichtungen durchgeführt. Bei der MRT wird das mittels des sensibilisierenden Gradientenfeldes erreicht. Nach der Bearbeitung der Daten ergibt sich ein mittleres richtungsunabhängiges Diffusion- Bild, das sogenannte TRACE-gewichtete Bild. Den Kontrast kann man durch die Auswahl eines größeren Wertes des sogenannten b-Faktors ( $s/mm^2$ ) verbessern. Der b- Wert ist der Faktor, der die Sensibilität auf Diffusion bestimmt. Er bestimmt den zu erwartenden Signalverlust für eine gegebene Diffusionskonstante. Je höher der b-Wert, desto besser kann man die Infarktzone abgrenzen. Mit dem steigenden b-Wert steigt somit die Sensitivität, allerdings nimmt das Signal- zu- Rausch Verhältnis (SNR) ab. Bei der diffusionsgewichteten Sequenz ist der Bildkontrast von der Geschwindigkeit der Molekularbewegung abhängig. Je schneller sich die Moleküle bewegen, desto stärker wird das Signal abgeschwächt. Deshalb erscheint die Zone mit verminderter Diffusion (z.B. die Infarktzone mit Verlust des Extrazellulärraumes bei schwellenden Zellkörpern) signalreicher als das umgebende gesunde Hirngewebe.

Im Grunde sind die Diffusionssequenzen T2- gewichtete Spin Echo– Ultrafast Echo Planar Imaging- Sequenzen (SE EPI). Um diese Diffusionswichtung zu erreichen, werden starke entgegengerichtete Gradientenpulse eingeschaltet. Der erste Puls bewirkt eine Dephasierung des Spins und der zweite eine Rephasierung, solange keine Diffusion stattfindet. Falls eine Bewegung da ist, bewirkt der zweite Puls eine Signalabschwächung. Wegen dieser T2- Komponente in der Sequenz ist es möglich, dass in den Diffusionsbildern T2- Effekte mit erfasst werden, welche auch als „T2- shine- through“ bezeichnet werden. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, wird eine

quantitative Messung der Bewegung der Moleküle durchgeführt. Dabei werden Bilder mit mindestens zwei verschiedenen b-Werten gemacht. Diese Bilder erlauben die Kalkulation des „anscheinenden Diffusionskoeffizienten“ („apparent diffusion coefficient“- ADC (in mm/s)) für jedes Pixel auf dem Bild. In den ADC- Bildern erscheinen die Regionen mit verminderter Diffusion dunkel im Vergleich zu dem umgebenden Gewebe. Hohe Signalintensitäten in der DWI entsprechen in der Akutphase eines Schlaganfalls dabei niedrigen ADC-Werten (je heller in DWI, desto dunkler in ADC).

### **2.4.3 T1- Sequenzen mit/ ohne ( $\pm$ ) Kontrastmittel**

Herkömmliche MR-Kontrastmittel wie Gd-DTPA (Gadolinium-Diethyltriamin-Pentaacetat) sind sog. ‚blood-pool agents‘, also streng intravasale lokalisierte Substanzen. Diese auf seltenen Erdsalzen basierenden Kontrastmittel führen zu einer Verkürzung der T1- Relaxation mit Erhöhung der Intensität in den entsprechenden T1- Sequenzen.

Je nach Molekülgröße aber auch Dichtigkeit der Gefäße treten diese intravenös applizierten Moleküle ins Gewebe über. Subtrahiert man nun die T1- Bilder nach Kontrastmittelgabe von den T1- Bildern ohne Kontrastmittel, kann dieser Kontrastmittelübertritt eindrucksvoll dargestellt werden (Abb. 4, Zeile C). Dabei erscheint erwartungsgemäß das gesunde Hirnparenchym nach der Subtraktion dunkel und nur in Arealen mit KM- Übertritt aus den Gefäßen in das Parenchym hell.

## **2.5. Magnetresonanztomographie und akuter Schlaganfall beim Menschen**

Die MRT bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der cCT bei der Schlaganfalldiagnostik: Darstellung und Abgrenzung akuter pathologischer Veränderungen durch die Diffusionsbildgebung, exzellente Parenchyndarstellung auch des Kleinhirns und Hirnstamms, hohe Sensitivität für Kontrastmittelübertritt aber auch für Mikroblutungen. In Kombination mit flussabhängiger und KM-gestützter Angiographie erlaubt sie eine sehr gute Darstellung der hirnversorgenden Gefäße.

In der Schlaganfalldiagnostik werden die Kombination von DWI und PWI für eine schnelle und verlässliche Darstellung des Infarkt und der Penumbra benutzt, sowie die T2- gewichteten Sequenzen für Differenzierung zwischen altem oder neuem Infarkt und Beurteilung der Ödembildung (Abb. 4, Zeile A; Flüssigkeit in T2-Bilder hyperintens) und die T2\*- Sequenzen für eine verlässliche Darstellung einer Blutung (hypointens/ dunkel). Die Nachteile dieser Technik sind die lange Dauer der Untersuchung, aufgrund der von dem Raum und Magnetfeld eingeschränkten Möglichkeit zum Überwachen. Der kleine Durchmesser und die Länge des Untersuchungsrohrs sind Ursachen für die mangelnde Compliance der Patienten. Die MRT- Untersuchung ist für Bewegungsartefakte sehr anfällig, was häufig bei den Patienten mit Schlaganfall in der akuten Phase zu schlechter Beurteilbarkeit der Bilder führt. Aufgrund des Magnetfeldes ist bei Patienten mit verschiedenen implantierten Fremdkörpern oder elektrischen Geräten die Untersuchung nicht möglich.

### **3. Fragestellung, Materialien und Methoden**

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der bi-phasischen Blut-Hirn-Schrankenöffnung nach Ischämie und Reperfusion und deren Korrelation zur Entwicklung des vasogenen zerebralen Ödems am Modell der transienten Fadenokklusion an der Ratte. Diese Untersuchungen wurden nicht-invasiv mittels serieller Untersuchungen in einem klinischem 3Tesla MRT mit Kontrastmittelgabe durchgeführt.

#### **3.1. Studiendesign und zeitlicher Verlauf**

Alle Experimente wurden nach Einholen eines positiven Votums der Ethikkommission, der Regierung der Oberpfalz und nach den Direktiven des Europäischen Komitees (86/609/EEC) und den Leitlinien für die Behandlung von Tieren durchgeführt. Alle Tiere wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Gesichtspunkte des Tierschutzgesetzes ordnungsgemäß behandelt und untergebracht. Während der ganzen Dauer des Experiments hatten die Tiere freien Zugang zu Futter- und Wasseraufnahme. In dieser Arbeit wurden insgesamt 17 Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) mit Gewicht von 250 bis 300g in zwei Gruppen verteilt. In der ersten Gruppe waren 11 Tiere, die einer 90-minütigen Okklusion der A. cerebri media (ACM) mit nachfolgender Reperfusion unterzogen wurden. Die zweite Gruppe mit 6 Tieren wurde nur operiert (Hautschnitt und Exposition der A. carotis) ohne die MCA- Okklusion (nachfolgend Sham Gruppe genannt). Die Experimentalgruppe wurde an sechs verschiedenen Zeitpunkten und die Sham- Gruppe an den letzten drei Zeitpunkten mittels MRT untersucht: vor Ischämie, 1 Stunde nach Ischämie („before reperfusion“ BR), nach Reperfusion („after reperfusion“ AR), 4, 24 und 48 Stunden nach Reperfusion („post reperfusion“ PR). Die Sequenzen für beide Gruppen sind in dieser Reihenfolge gelaufen: DW EPI,

T2 TSE, T2- Relaxometrie, T1SE und post-KM T1SE, wobei die T2- Relaxometrie an allen Zeitpunkten, die diffusions-gewichteten Echo- Planar (DWEPI) und die T2-gewichteten Turbo- Spin- Echo (T2TSE) Sequenzen an den BR, AR, 04PR, 24PR und 48PR, die T1-gewichteten Sequenzen nur an den letzten 04PR, 24PR und 48PR durchgeführt wurden.

Als Ausschlusskriterien wurden festgelegt: Fehlen von fokal-neurologischen Defiziten 5 Minuten nach Okklusion, fehlender Nachweis eines Infarktes im Versorgungsgebiet der A. cerebri media auf den T2- und diffusion-gewichteten Sequenzen, Nachweis von Blutungskomplikationen in der Bildgebung oder Tod während der Experiments.

### **3.2. Ischämiemodell**

Die operative Okklusion der A. cerebri media (ACM) wurde mit einigen Modifikationen nach dem von Spratt et. al. (Longa et. al., 1989; Neil et al., 2006) beschriebenen Fadenmodell durchgeführt. Die Einleitung in die Anästhesie erfolgte mit 5% Isofluran in 70% Stickstoff und 30% Sauerstoff. Nach endotrachealer Intubation wurde die Anästhesie weiter nach Reduktion von Isofluran auf 1.5% aufrecht gehalten. Eine Kunststoffkanüle wurde in die Vena femoralis eingeführt, um die Kontrastmittelgabe für die T1- gewichteten Sequenzen zu ermöglichen. Die Körpertemperatur wurde während der ganzen Operation konstant bei 37-37,5°C über ein Heizkissen gehalten. Die Tiere wurden im Halsbereich vom Unterkiefer bis zum Sternum rasiert und desinfiziert. Durch eine Mittellinieninzision der Haut am Hals und Präparation der Muskeln erfolgte die Darstellung der linken Arteria carotis communis (ACC), der Arteria carotis externa (ACE) und der Arteria carotis interna (ACI). Die distale ACC und die ACI wurden transient mit einem 4-0 Faden ligiert. Nach einer Arteriotomie der ACE wurde ein 3cm langer, mit Silikon beschichteter 4-0 Nylonfaden

(Ethicon) über die ACE in die ACI vorgeschoben, bis ein leichter elastischer Widerstand zu spüren war. Dies galt als Zeichen für die erfolgte Okklusion der ACM. Anschließend wurde der Faden mit einer Ligatur fixiert. Nach der intraluminalen Naht wurde der Hautschnitt mit Seidenfäden versorgt. Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere so lange gewärmt, bis sie vollständig erwacht waren und sich frei bewegten. Im Anschluss wurden die Versuchstiere wieder in ihre Käfige zurückgebracht. Eine Stunde nach Okklusion wurden erneut 1.5% Isofluran in Mischung mit Stickstoff und Sauerstoff für die Narkose eingeleitet. Dann erfolgte die MRT während der Ischämiephase (Zeitpunkt ‚before reperfusion‘ BR). Nach 90 Minuten und erfolgter MRT wurde der okkludierende Faden zurückgezogen, um Reperfusion zu ermöglichen. Die Wunde wurde wieder mit Seidenfäden geschlossen, die Tiere im MRT repositioniert und die MRT nach Reperfusion (Zeitpunkt ‚after reperfusion‘ AR) durchgeführt. Die letzten Schritte der Kurznarkose wurden für die Bildgebung an 04PR, 24RP und 48PR wiederholt. Nach jeder erfolgten Bildgebung wurden die Tiere so lange erwärmt, bis sie vollständig erwacht waren und sich frei bewegten. Erst dann wurden sie in die Käfige zurückgebracht.

### **3.3. Kernspintomographie**

Alle Experimente wurden an einem klinischen 3T- Kopf- MRT (Magnetom Allegra®, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) mit 40 mT/m- Amplitude erreichenden Gradienten und Slew Rate von 400mT/m/s pro Achse durchgeführt. Das Standardzubehör für den Scanner wurde durch eine für Ratten konzipierte 4-Kanal „phased array“ Kopf- Spule (RAPID Biomedical GmbH, Würzburg, Germany) erweitert. Die Bildgebung erfolgte mit 1mm dicken koronaren Schichten, angefangen 7mm hinter der anterioren Spitze des frontalen Cortexes.

Die quantitative Bestimmung der T2- Relaxationszeit erfolgte an allen Zeitpunkten (Kontrolle, AR, PR, 04PR, 24PR, 48PR). Die DW EPI- und die T2TSE- Bilder wurden an 04PR, 24PR, und 48PR Zeitpunkten gemacht. Die T1- gewichteten Sequenzen wurden vor und nach Kontrastmittel (KM), Spinecho Sequenzen (T1SE) jedoch nur an 04PR, 24PR und 48PR durchgeführt. Die Sequenzen wurden in dieser Reihenfolge gemacht: DW EPI, T2 TSE, T2- Relaxationsmessung, T1SE und T1SE nach KM.

Die DW EPI Bilder wurden mit Repetitionszeit (TR) = 3300ms, Echozeit (TE) = 105ms, field of view (FoV) = 6.7 cm und Matrixgröße = 104 x 104 gemacht. Die DW EPI- Bilder wurden mit fünf unterschiedlichen Diffusionswichtungen (b- Werte = 0, 500, 1000, 1500 & 2000 s/mm<sup>2</sup>) in drei orthogonalen Richtungen wiederholt. Mit den Informationen wurde der „anscheinende Diffusionskoeffizient“ (‘apparent diffusion coefficient’ ADC) generiert.

T2TSE Sequenzen haben TR = 3330 ms, TE = 70 ms und Turbo- Factor = 7. T2- Relaxation wurde mittels Spin- Echo- Sequenzen- Multiecho- Bildern ermittelt. Die Spin- Echo Sequenzen wurden sieben Mal mit dem gleichen TR- Wert von 3330 ms und mit sieben verschiedenen TE Werten (29, 58, 88, 117, 146, 175 & 204 ms) erzeugt.

Um die Veränderung der BHS- Permeabilität zu berechnen, wurden vor und nach KM- Gabe T1- gewichtete Sequenzen mit den Eigenschaften TR = 900 ms und TE = 10 ms erzeugt. Nach der Durchführung der T1- gewichteten Bilder wurde 0.2 mmol/kg Gd-DTPA (Molekulargewicht 590Da, Magnevist®, Shering, Deutschland) injiziert und ca. 25 min. nach der Gabe wurde die post- KM T1- gewichtete Sequenz gemacht. Diese doppelt so hohe Kontrastmitteldosis verglichen zum Menschen hatte in Vorabversuchen ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis gezeigt, liegt dennoch

unter der z.B. in Studien zur multiplen Sklerose verwandten ‚triple-dose‘ (0.3mmol/kg KG).

Die TSE und die SE wurden mit FoV von 2,5cm durchgeführt und die Bilder wurden rekonstruiert mit einer Matrizengröße von 128 x 128. Die EPI Sequenzen hatten In-plane Resolution von 600  $\mu\text{m}$ , die SE von 200  $\mu\text{m}$  mit 1mm Schichtdicken.

### **3.4. Datenanalyse**

Zur Datenanalyse wurde eine standardisierte coronare Schicht herangezogen, die 1mm dick und 7mm posterior von der anterioren Rinde des Frontalcortex lokalisiert war. Hier hatte sich in den Vorversuchen die konstanteste und repräsentativste Ischämiezone gezeigt. Für die quantitative T2- Relaxometrie wurden auf dem ipsi- und kontralateralen Striatum und auf der ipsilateralen Rinde drei Regionen von Interesse (ROI) definiert. Die runden ROI in der Region des Ncl. Caudatus wurden so gewählt, dass möglichst viel Gewebe unabhängig davon, ob gesund oder ischämisch, für die Berechnungen genommen wurde (Abb. 4). Die Liquorräume verblieben außerhalb dieser Regionen. Zur Visualisierung der Veränderungen der T2- Relaxation wurde eine mono-exponentielle nichtlineare Kurve benutzt, die mit Hilfe von Graphpad Prism Version 5.00 für Windows (Graphpad Software, San Diego, California, USA) ausgerechnet wurde. Für die Messung des Hemisphären-Volumens wurden die installierte Siemens build- in- Programme (Syngo 2004A®, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) benutzt.

Zur Erfassung der Permeabilitätsänderungen der BHS wurden Bilder ausgewertet, die durch Subtraktion von T1- gewichtetem Spin Echo vor KM- Gabe und T1- gewichtetem Spin Echo nach KM- Gabe generiert wurden. Das über die Blut-Hirn-Schranke ausgetretene Volumen an KM (‚permeable BBB volume‘ PBV) in

Kubikzentimetern (cm<sup>3</sup>), wie auch die durchschnittliche Intensität des Signals („signal intensity difference’ Sldiff) von den hyperintensiven Regionen, wurden mit Hilfe der Standard- Auswerteprogramme von Siemens (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) erfasst. Das Produkt von Sldiff und PBV wurde ausgerechnet, um die Darstellung der Zunahme der ausgetretenen Menge an Gd-DTPA KM im zeitlichen Verlauf zu erleichtern. Um die Werte der Sham-Tiere mit den Werten der operierten Tiere zu vergleichen, wurden die T1-gewichteten prä- und post- KM-Gabe Bilder subtrahiert und danach ein Mittelwert ermittelt.

### **3.5. Statistische Auswertung**

Während der gesamten Studie wurden die gemessenen Werte gemittelt und der Standardfehler (SEM) beigefügt (mean ± SEM). Wiederholte ANOVA gefolgt vom Tukey- Kramer- post- hoc- Tests wurden für die Innergruppenvergleiche herangezogen. Bei dem Vergleich von verschiedenen Gruppen (z.B. ischämisch gegen Sham) zu verschiedenen Zeitpunkten wurden ungepaarte „t“-Tests mit der Wel’schen Korrektur korrigiert. Ein P-Wert <0.05 wurde für statistisch signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

Drei von den 11 Tieren haben die Zeit des Experiments nicht überlebt, deshalb wurden 8 Tiere für die Auswertung (N=8) genommen. In der ipsiläsionalen Hemisphäre zeigten die post- KM- T1-Bilder einen signifikanten Signalverlust nach 24PR im Vergleich zur 04- und 48PR (Graphik: 1A; Abb. 4) und zudem eine Steigerung der absoluten Kontrastmittelmenge PBV von 4PR gegenüber 48PR. Die postreperfusion- ermittelten T2- Werte auf der ipsilateralen Seite blieben im Vergleich zu den Werten vor Ischämie deutlich erhöht. Es ist zu bemerken, dass die Bilder in der 4. Stunde nach Reperfusion ähnliche T2- Werte für beide ipsi- und kontralaterale Regionen des Nucleus caudatus zeigen.

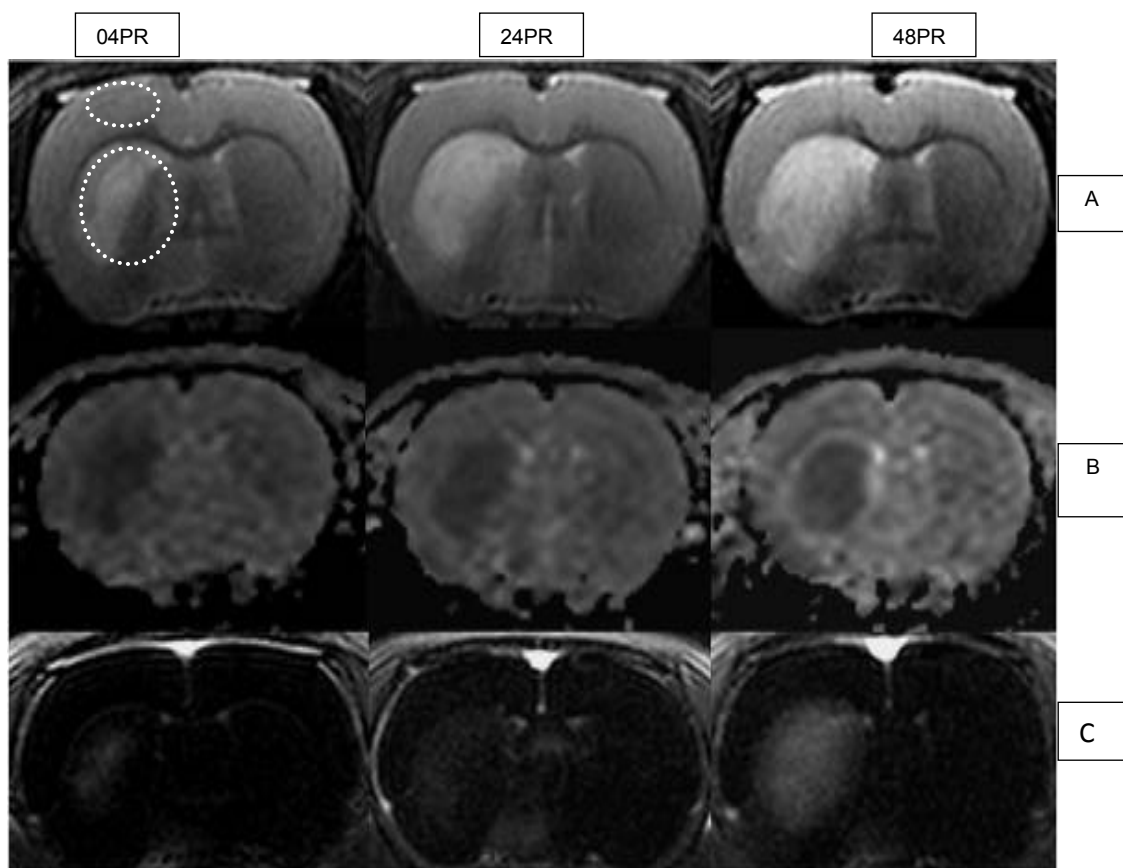
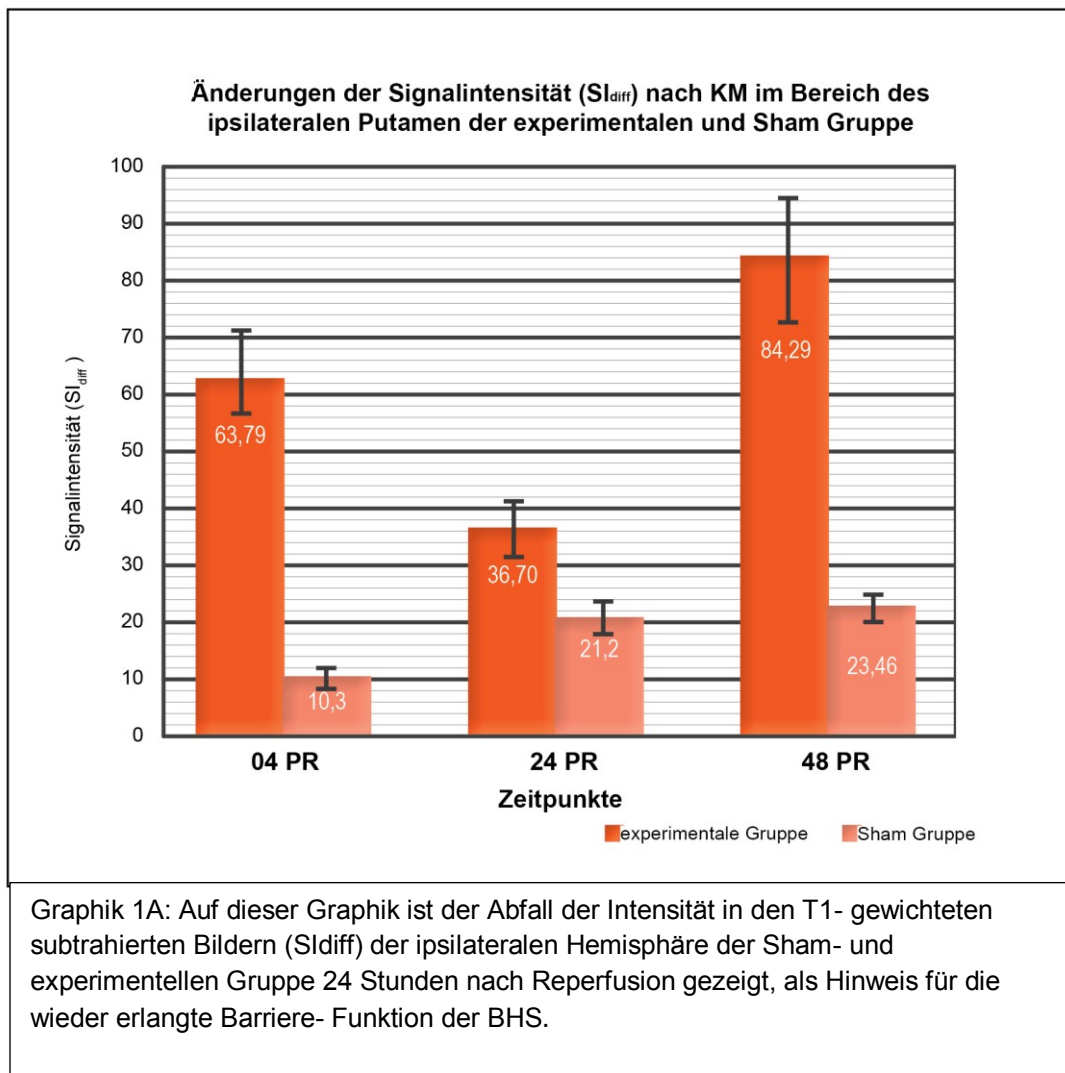


Abb.4: Repräsentative Bilder für T2- TSE (Zeile A), ADC (Zeile B) und subtrahierte T1- SE (Zeile C) an den 04, 24 und 48 PR. Die umkreisten Regionen auf den T2- Bildern 04PR Bild wurden für die T2-Relaxometrie-Auswertung übernommen.

Das ischämische Areal der linken Hemisphäre zeigt eine stärkere Intensität (Abb. 4 obere Reihe T2) verglichen mit dem korrespondierenden kontralateralen Areal. Die zweite Reihe zeigt denselben Infarkt in den ADC-errechneten Bildern als hypointens (dunkel), während dieses in den T1- gewichteten und subtrahierten Sequenzen hyperintens (hell) imponiert.



#### 4.1. Die bi-phasische Öffnung der BHS nach Okklusion-Reperfusion

Die zeitlichen Veränderungen der Werte in subtrahierten T1- gewichteten Bildern  $SI_{diff}$ , PBV, das Produkt aus  $SI_{diff}$  und PBV für die ischämische Hemisphäre und die

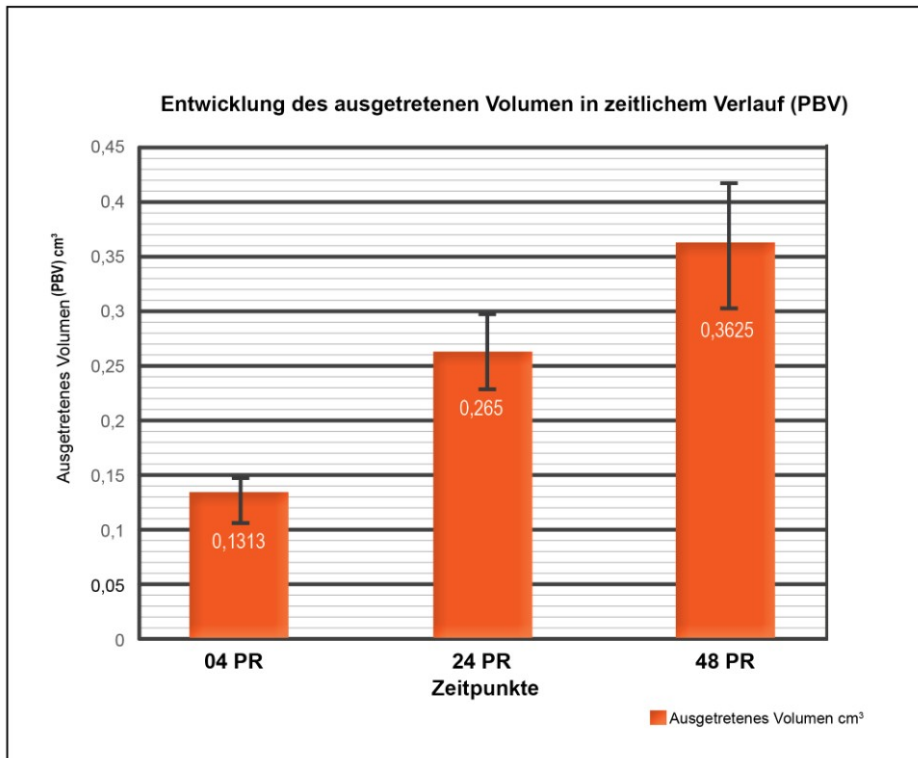
Post- KM Bilder von kontralateralem Nucleus caudatus wurden mit denen der Sham-Tiere verglichen (Graphik: 1A-C).

Am 04PR- Zeitpunkt waren die Werte bei den post- KM  $SI_{diff}$  des ipsilateralen Putamen ( $63.79 \pm 8.2$ ,  $P=0.0003$ ) signifikant höher als die Werte der Sham- Tiere ( $10.3 \pm 0.79$ ) (Graphik 1A). Die PBV ( $0.13 \pm 0.02$ ) und die  $SI_{diff} \times PBV$ -Werte (Graphik 1B-C) der ischämischen Seite waren auch signifikant höher ( $8.67 \pm 1.77$ ,  $P=0.0002$ ) im Vergleich zur Sham- Gruppe ( $1.34 \pm 0.23$ ).

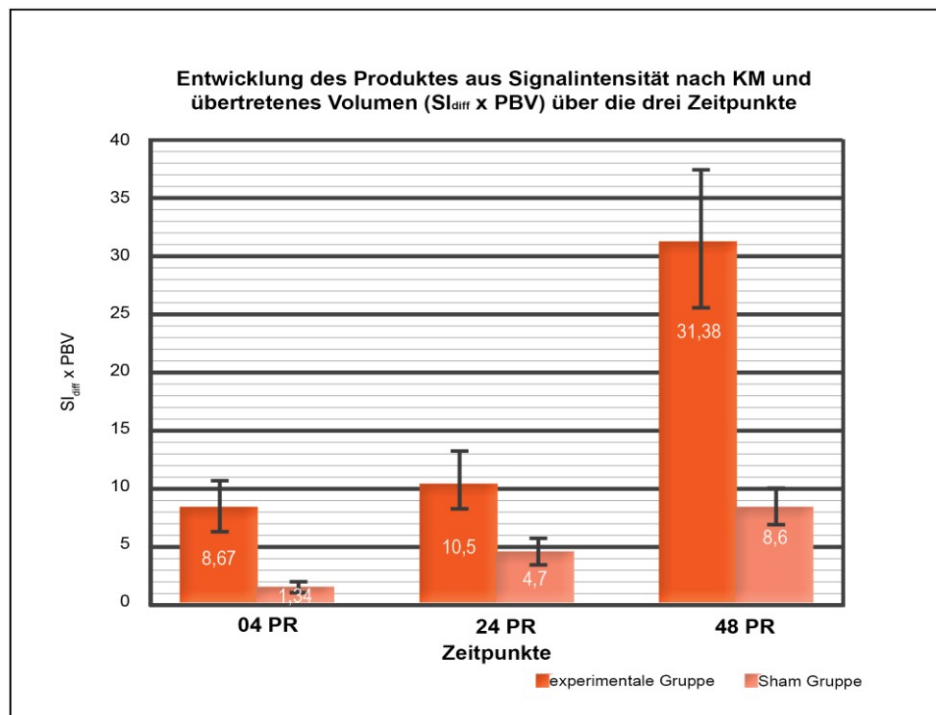
Die kontraläsionale Hemisphäre der operierten Tiere zeigte keinen signifikanten Abfall der Werte auf den post- KM- T1- gewichteten Bildern ( $10.95 \pm 1.28$ ) im Vergleich. Die Intensität der post- KM- Bilder 24h nach Reperfusion ( $36.70 \pm 4.61$ ) war signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger im Vergleich zu 04PR (Abb.4 A), aber immer noch höher ( $p = 0.0132$ ) als die Intensität in der Sham Gruppe ( $21.2 \pm 1.623$ ) (Graphik 1A). Das  $SI \times PBV$  Produkt am 24PR zeigte keine signifikante Erhöhung ( $10.50 \pm 2.43$ ) im Vergleich zu 04PR, war aber signifikant ( $p=0.0483$ ) hoch verglichen mit der Sham-Gruppe ( $4.7 \pm 0.60$ ). Die post- KM- Werte auf der kontralateralen Seite ( $12.11 \pm 1.61$ ) waren nicht signifikant höher als die am 04PR, aber signifikant niedriger als Sham ( $19.9 \pm 0.85$ ,  $p = 0.0004$ ). Auf den 48PR post- KM- Bildern (Graphik 1A) waren die Werte ( $84.29 \pm 11.99$ ) im Vergleich zu 24PR ( $P < 0.001$ ) und Sham ( $23.46 \pm 1.52$ ;  $P = 0.0015$ ) signifikant höher.

Die Steigerung des PBV ( $0.36 \pm 0.055 \text{ cm}^3$ ) nach 48PR war nicht signifikant, aber das  $SI \times PBV$  ( $31.38 \pm 5.98$ ) war höher ( $P < 0.01$ ) im Vergleich zu 24PR und auch zu Sham ( $8.6 \pm 1.44$ ,  $P = 0.0227$ ) (Graphik 1C).

Die kontralaterale Seite zeigte nach KM-Gabe höhere Intensitäts- Werte ( $15.29 \pm 1.19$ ) als nach 24PR und niedrigere als Sham ( $23.11 \pm 1.088$ ) ( $P < 0.01$ ).



Graphik 1B: Diese Graphik stellt den kontinuierlichen Anstieg des Kontrastmittelvolumens als Hinweis für die BHS- Permeabilität im Gebiet der ipsilateralen Putamen (cm<sup>3</sup>) während des Experiments dar.



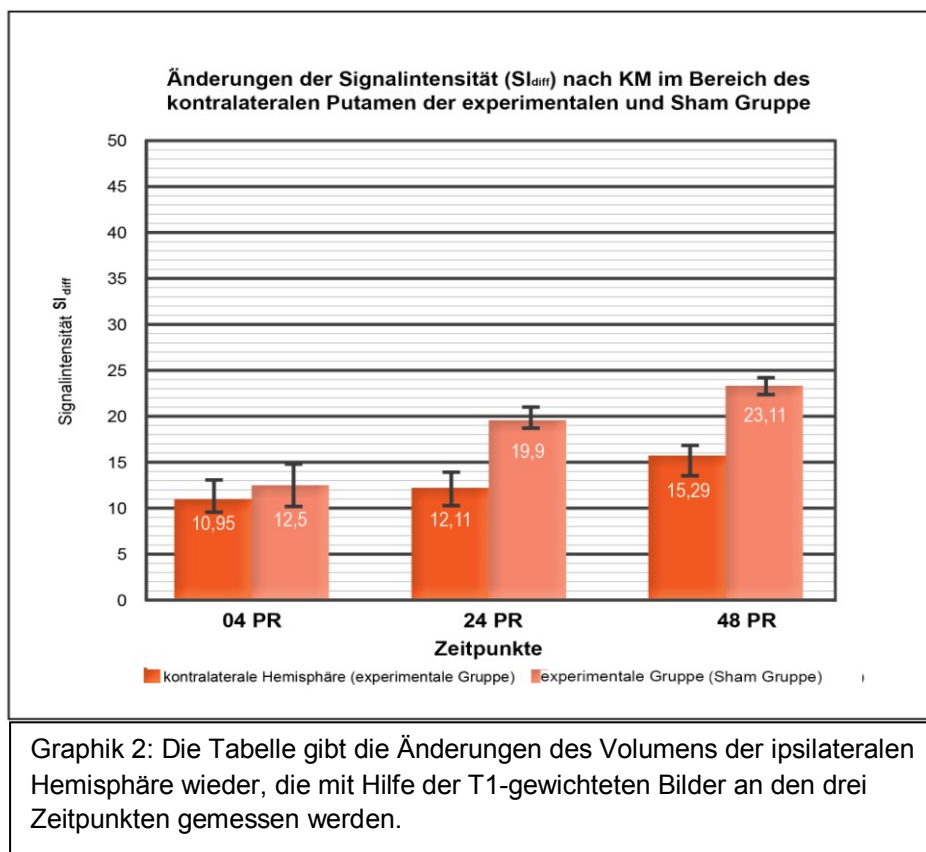
Graphik 1C: Diese Graphik stellt die Veränderungen des Produktes aus PBV X  $SI_{diff}$  des ipsilateralen Striatum im Vergleich zu der Scham-Gruppe dar. Dieses Produkt wurde zur besseren quantitativen Darstellung des Hirnparenchyms mit BHS-Funktionsstörung ausgerechnet.

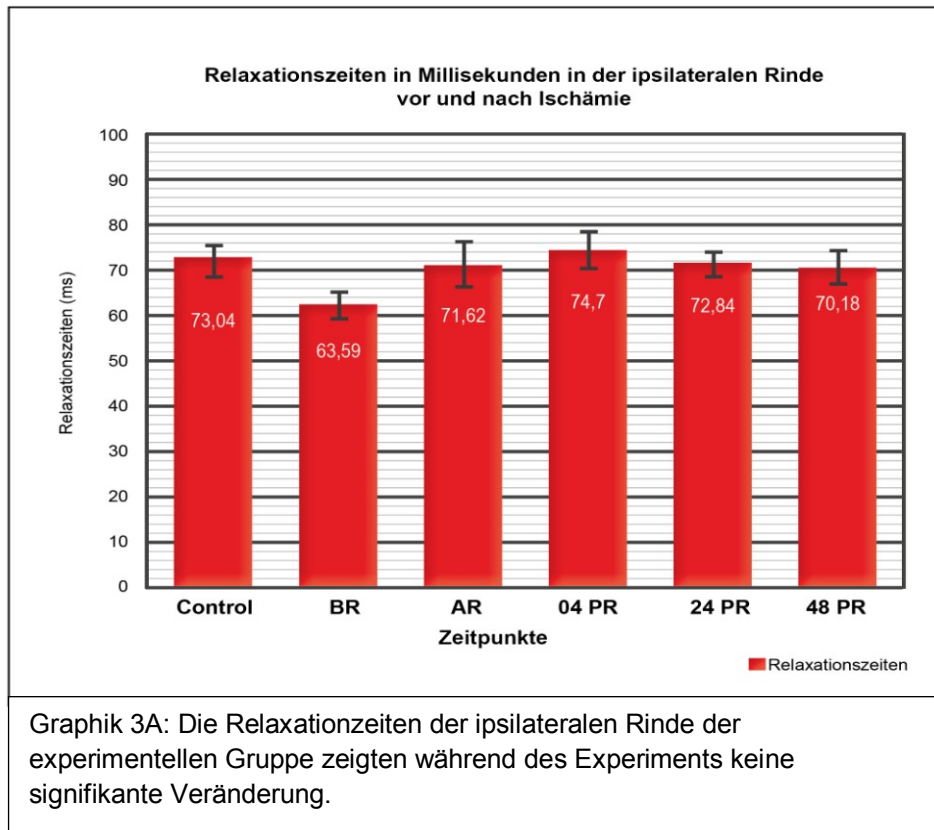
#### 4.2. Die zeitliche Entwicklung der transversalen Relaxationzeiten

Die transversalen Relaxationzeiten als Hinweis für die Ödementwicklung wurden bei den gesunden, den ischämischen und den Tieren nach Reperfusion für das Putamen auf der linken und rechten Seite und für die Rinde auf der ipsilateralen ischämischen Seite gemessen (Graphik 3A-C).

Die Kontroll- T<sub>2</sub>- Werte der Hirnrinde waren  $73.04 \pm 2.313\text{ms}$  mit einem kleinen Unterschied zwischen beiden Hemisphären. Die Kontroll- T<sub>2</sub>- Werte des Putamens waren auf der ipsilateralen Seite  $68.56 \pm 3.58\text{ms}$  und auf der kontralateralen  $66.68 \pm 1.38\text{ms}$ .

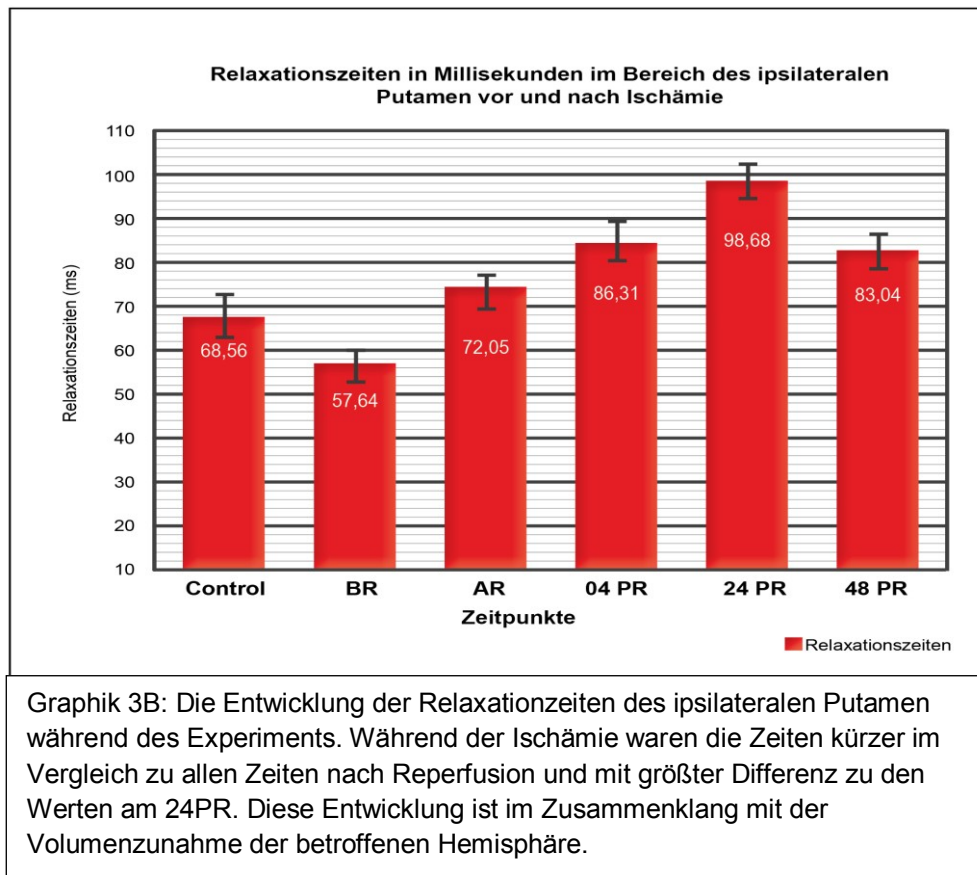
Während der Ischämie (BR) verkürzten sich die T<sub>2</sub>- Relaxationszeiten für das Putamen auf  $57.64 \pm 2.625\text{ms}$ , für die Rinde auf  $63.59 \pm 2.52\text{ms}$ . Die T<sub>2</sub>- Relaxationszeiten waren für das kontralaterale Putamen während Ischämie auf  $72.75 \pm 5.617\text{ms}$  verlängert. Diese Änderungen haben aber keine statistische Signifikanz.





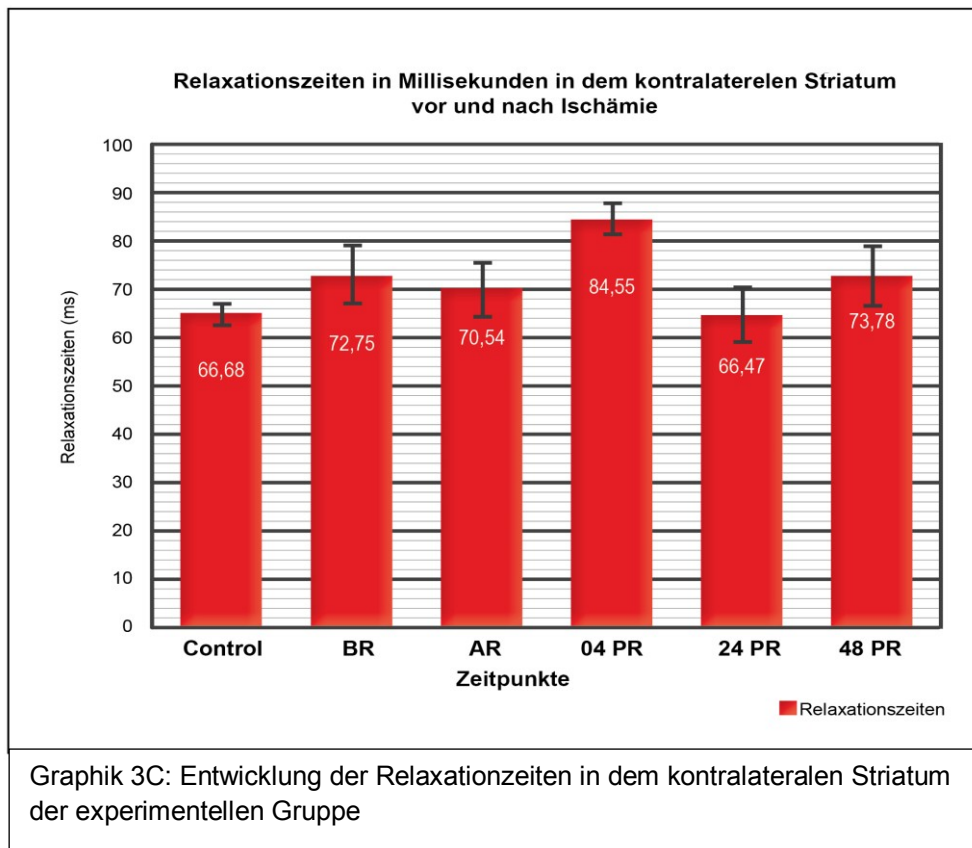
Nach der Reperfusion (AR) haben sich die Zeiten im Vergleich zu den Werten während der Ischämie, für das ipsilaterale Putamen auf  $72.05 \pm 3.4$  ms und für die Hirnrinde auf  $71.62 \pm 3.7$  ms verlängert. Die Zeiten für die kontralaterale Seite waren nicht im Vergleich zu den unter Ischämie gemessenen signifikant verlängert.

4 Stunden nach Reperfusion (04PR) zeigten die T2-Zeiten für das Putamen eine signifikante Verlängerung auf der betroffenen Seite ( $86.31 \pm 3.71$  ms;  $p < 0.01$ ) und auf der gesunden Seite ( $84.55 \pm 3.36$  ms,  $p < 0.05$ ) im Vergleich zu den Kontrollwerten. Die Zeiten für die Rinde waren nur gering und nicht signifikant länger als die Zeiten der Kontrolle ( $66.47 \pm 4.56$  ms). Das Volumen der ipsilateralen Hemisphäre 4 Stunden nach Reperfusion war  $0.60 \pm 0.01$  cm<sup>3</sup> (Graphik 2).



24 Stunden nach Reperfusion war nicht nur eine signifikante Veränderung der ipsilateralen Werte für das Putamen ( $98.68 \pm 3.12$  ms) im Vergleich zu beiden 04PR ( $p < 0.05$ ) und Kontrolle ( $p < 0.001$ ), sondern auch ein signifikanter Anstieg des hemisphärischen Volumens ( $0.62 \pm 0.02$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.05$ ; Graphik 2) festzustellen. Die Zeiten auf der kontralateralen Seite zeigten keine wesentliche Verkürzung für die Rinde ( $72.84 \pm 2.41$  ms), aber eine signifikante für das Striatum ( $66.47 \pm 4.56$  ms;  $p < 0.05$ ) im Vergleich zu 04PR.

Nach 48PR waren die Werte für das Putamen ( $83.04 \pm 3.4$  ms) signifikant zu den 24PR ( $p < 0.01$ ) gefallen, aber immer noch höher ( $p < 0.05$ ) als die Kontrollwerte. Diese Änderung war von einer signifikanten Verkleinerung der ipsilateralen Hemisphäre ( $0.59 \pm 0.02$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ ) begleitet.



Die kontralaterale Seite zeigte keine signifikante Änderung der Werte weder für die Rinde ( $70.18 \pm 3.3$  ms), noch für das Striatum ( $73.78 \pm 5.17$  ms) im Vergleich zu 24PR-Werten.

## **5. Diskussion**

In dieser Studie wurde die bi-phasische Permeabilitätserhöhung der BHS nach dem transienten Verschluss der MCA mittels klinischem 3T MRT in vivo gezeigt. Darüber hinaus wurde die begleitende vasogene Ödementwicklung im Verlauf quantifiziert. Wir konnten eine starke Ödementwicklung mit Maximum bei 24 Stunden und darüber hinaus eine Größenabnahme des Ödems als Hinweis für die Resorption des Ödems im Verlauf zeigen, die insbesondere in den späteren Phasen nach Ischämie und Reperfusion nicht mit dem Maß der Blut-Hirn-Schrankenöffnung korrelierten. Die Entwicklung des Ödems mit peak nach 24h korrelierte nicht mit den Maxima der BHS-Öffnung nach 4h und 48h Reperfusion. Darüber hinaus zeigten sich Hinweise für Ödembildung auf der kontralateralen, nicht-ischämischen Hemisphäre, die auf systemische Effekte des Schlaganfalls hindeuten.

### **Der zeitlicher Verlauf der Blut-Hirn-Schranke-Permeabilitätsstörung**

Bislang wurden drei Phasen der Erhöhung der BHS-Permeabilität mit Betonung auf die Öffnung der parazellulären TJ- Kontakte erfasst (Kuroiwa et al., 1985; Huang et al., 1999; Latour et al., 2004). Die anfängliche kurzanhaltende Veränderung der Permeabilität scheint mit dem erhöhten regionalen Blutfluss (rCBF) nach Reperfusion assoziiert zu sein. Diese Phase der Hyperämie wird von der „bi-phasischen“ Antwort der BHS gefolgt (Huang et al., 1999). Die hier präsentierte Studie fokussierte sich auf die „bi-phasische“ Veränderung der Permeabilität der BHS und nicht auf die initiale eher hämodynamisch und unmittelbar bei Beginn der Reperfusion kurze BHS-Permeabilitätserhöhung.

Mindestens drei Komponenten des Ischämie–Reperfusionsschadens (I/R) scheinen hier eine Rolle zu spielen und partiell überlappend die Entstehung dieses Phänomens zu induzieren:

1. Direkte metabolisch-toxische Schädigung auf die neurovaskuläre Einheit,
2. Die entstehende entzündliche Reaktion und der Reparaturvorgang,
3. Die Regenerationsmechanismen (z.B. die Angiogenese).

In Übereinstimmung mit publizierten Daten zeigten sich 4 Stunden nach Reperfusion in den post- KM- T1- gewichteten Bildern hyperintense Regionen im ipsiläsionalen Striatum infolge der erhöhten Permeabilität der BHS für Gd- DTPA (Heo et al., 2005; Wang et al., 2007). Diese erste Phase des „bi- phasischen“ Musters der Permeabilitätsstörung wird in Verbindung gebracht mit der entzündlichen Reaktion, dem oxydativen Stress an der BHS und der enzymatischen Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM). Weitere Entzündungsmediatoren wie Thrombin, Bradykinin, Histamin können darüber hinaus die Permeabilitäts-Eigenschaften der BHS durch Aktin-Polymerisation verursachte Schwellung der Endothelzellen (EZ) und Formierung von inter- endothelialen Lücken induzieren (Ahmed et al., 2005). Es wird beschrieben, dass proteolytische Matrix- Metalloproteasen (MMP), wie MMP- 2, in dieser frühen Phase nach dem ischämischen Ereignis eine Degradierung der TJ- Proteine vermitteln (Yang et al., 2007). Die reversible schädliche Wirkung durch oxydativen Stress wurde am Beispiel der destruktiven Wirkung des Wasserstoffperoxyds auf die physiologischen, biochemischen und immunzytochemischen Parameter der TJ erforscht (Meyer et al., 2001). Desweiteren wird die Expression von „vascular endothelial growth Factor“ (VEGF) und Angiopoetin-2 (Ang-2) in den ersten 1-3 Stunden nach Ischämie hochreguliert (Croll et al., 2001). Diese Proteine erreichen ihre Spitzenkonzentrationen erst später

während des schwerwiegenden Ödems. Diese liegen allerdings vor dem destabilisierenden Effekt durch die Angiogenese bzw. auf die Endothelzellen, was deren Rolle für die frühe BHS- Permeabilitäts- Erhöhung vernachlässigt. Es wurde auch eine Korrelation zwischen der Infiltration von neutrophilen Leukozyten in das Hirngewebe und der gleichzeitigen bi-phasischen Störung der Permeabilität gezeigt (Sandoval et al., 2008). Diese Informationen lassen die Annahme zu, dass die gestörte TJ- Funktion nicht unbedingt die Ursache für die neutrophile Infiltration ist, möglicherweise trägt sie aber dazu bei. Diese TJ- Funktionsstörung wird durch die Wirkung der MMP und/oder durch den nach I/R entstehenden oxydativen Stress verursacht. Weil diese Veränderungen nur an Modellen mit temporärer und nicht an Modellen mit permanenter Okklusion nachgewiesen wurden, ist die Annahme erlaubt, dass dieser oxydative Stress nach Reperfusion die Ursache für die nicht vollständig wiedererlangte Funktion der TJ sein kann. Diese wurde durch die Abnahme der Intensität in den subtrahierten MR- Bildern nach 24 Stunden Reperfusion als Hinweis für den verminderten Gd- DTPA- Übertritt in unserer Studie dargestellt.

Der ersten Phase der „bi- phasischen“ BHS- Permeabilitätsänderung mit erhöhter Durchlässigkeit für KM nach 4h I/R folgte eine Erniedrigung der ipsiläsionalen Signalintensität in den post- KM- T1- gewichteten Sequenzen nach 24 Stunden. Allerdings zeigte die Messung der PBV einen im Vergleich zu dem nach 4 Stunden verdoppelten Wert. Es liegt nahe, dass dieser tiefe Fall der  $SI_{diff}$ - Werte nach 24 Stunden ein Hinweis auf temporäre Regeneration der BHS sein kann. Andererseits waren die  $SI_{diff}$ - Werte immer noch höher als die von Sham- Tieren, dies deutet an, dass sich die TJ- Funktion bzw. die BHS als Ganzes noch nicht vollständig erholt hat. Der  $SI_{diff}$ - PBV- Wert, also das Produkt aus Volumen von Hirngewebe und

extravasiertem Kontrastmittel, hatte sich kaum 24 Stunden nach I/R im Vergleich zu 4 Stunden nicht verändert.

Die genauen Mechanismen, die zu dieser wiedererlangten Funktion der BHS führen, sind noch nicht klar. Zwei wesentliche Mechanismen werden diskutiert: Schädigung der TJPs durch ROS (Reactive oxygen species), welche eine Reversibilität nach 6 Stunden zeigt, während inflammatorische Mediatoren eine Rundung bzw. Auftreibung der zerebralen Endothelzellen verursachen, die auch durch vollkommen funktionierende TJ nicht korrigiert werden kann. In diesem Zustand erlaubt die BHS einerseits die Bewegung von Wasser entlang der durch die Ionenkanäle gebildeten osmotischen Gradienten. Gleichzeitig verhindern die intakten TJ's nur teilweise den weiteren para- endothelialen Austritt von Gd-DTPA.

48 Stunden nach I/R haben wir eine weitere Erhöhung der Permeabilität für GD-KM sowie einen größeren Bereich mit einer solch gestörten BHS detektiert, was sich durch die Änderung der Werte für  $SI_{diff}$  und PBV bemerkbar macht. Dieser zweite Peak der bi-phasischen BHS Öffnung wurde ebenfalls schon in der Literatur beschrieben und basierte auf Experimenten mit Evan's Blau- Färbungen (Belayev et al, 1996; Kuroiwa et al., 1985; Huang et al., 1999). Mittels der T2-Relaxometrie konnten wir nun darüber hinaus zeigen, dass es bereits zu diesem Zeitpunkt zu einer Verringerung des vasogenen Ödems mit Reduktion des ipsiläsionalen Hemisphärenvolumens kommt.

Für den zweiten Peak der bi-phasischen para-endothelialen BHS- Öffnung kann insbesondere die Expression von VEGF, monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) und MMP-9 verantwortlich gemacht werden. Insbesondere VEGF und Ang2 und deren Rezeptoren sind nach 48h maximal hochreguliert und induzieren die post-hypoxämische Neoangiogenese. Gleichzeitig sezernieren die Astrozyten und die

hirneigenen Endothelzellen den MCP-1, die die Permeabilitäts- Eigenschaften der BHS ändern und zusammen mit der Runterregulierung/Translokation der TJ-Proteine wie z.B. Occludin, ZO-1, ZO-2 und Claudin-5 und den Übertritt neutrophiler Granulozyten in das Hirngewebe im Bereich der Läsion ermöglichen (Stamatovic et al., 2005). Diese neutrophile Infiltration als Quelle für MMP-9 wurde als Mediator für vasale Ödembildung und hämorrhagische Transformationen im TIA- Model beschrieben (Gidday et al., 2005).

### **Die Ödementwicklung**

Sowohl die T2- Relaxometrie als auch die Messung des Hemisphärenvolumens zeigten eine signifikante Zunahme mit einem Maximum 24 Stunden nach I/R. Die Koinzidenz, signifikanter Abfall des  $SI_{diff}$  PBV- Werts (Maß für den para-endothelialen Übertritt von Kontrastmittel über die BHS) bei gleichzeitiger Zunahme des vasogenen Hirnödems, deutet darauf hin, dass der para-endotheliale Efflux bei TJ- Dysfunktion nicht als ursächlich für die zerebrale Ödembildung gilt. Eine Möglichkeit stellt die Gruppe der nicht-selektiven kationischen transienten Rezeptor-Potenzial- Kanäle (TRP) dar, die als Redox- Sensoren in dem vaskulären Endothel und in den Neuronen vorhanden sind (Groschner et al., 2004). Es ist wahrscheinlich, dass diese TRP`s die molekulare Basis für die oxydativ-aktivierten Kationen-Kanäle darstellen. Sie wurden auch als sehr wichtig für die Regulation der BHS-Funktion und vor allem für die Bildung des Hirnödems erkannt (Ahmmed et al., 2005; Lee et al., 2002). Sie können die monovalente Leitfähigkeit, das Membranpotential und den kationischen Gradienten beeinflussen. Die biophysikalischen Eigenschaften der TRP werden durch die Aufnahme von Kationen über die TRP- Kanäle in physiologischen Bedingungen getriggert (Eder et al., 2005). Der Influx von  $Na^+$ -Ionen wurde in

Verbindung mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsschwankungen und pathologisch hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gebracht (Paltauf-Doburzynska et al., 2000; Lee et al., 2002; Craner et al., 2004). Die Befunde können mit der nach 12 bis 24 Stunden beginnenden trans- endothelialen Durchlässigkeit der BHS für Natrium (und nachfolgend Wasser) nach I/R der ACM in Übereinklang gebracht werden (Gotoh et al., 1985). Diese gesteigerte Proliferation und die Up- Regulation solcher Kanäle können eine Folge des kontinuierlichen oxydativen Stresses sein, der nach der Reperfusion entsteht. Andere mögliche Ursachen stellen die Anhäufung von neutrophilen Granulozyten und die durch übergetretenes Albumin und andere Serumproteine aktivierte Ausschüttung von Superoxiden durch die Mikroglia dar (Abraham et al., 2002).

Die Reduktion der T2-Werte und das verkleinerte Volumen der ipsiläsionalen Hemisphäre zu dem letzten Zeitpunkt sind Hinweise für eine Resorption des vasalen Ödems. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber noch nicht geklärt. Es können mehrere verschiedene Mechanismen für die Rückresorption des Ödems verantwortlich sein. Zum einen kann der durch die Gliazellen aufgenommenen Proteine aus dem extravasalen Raum reduzierte onkotische Druck (Klatzo et al., 1985) oder es kommt zu einem gesteigerten Efflux in den Ventrikelraum.

In letzter Zeit wurden mehrere selektive Wasserkanäle beschrieben, besonders die Aquaporine (AQP`s), die eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Hirnödems spielen. Mehrere Studien an Tieren und Menschen zeigten eine Spitzenkonzentration 48 Stunden nach Reperfusion. Weil oben erwähnte Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt der Resorption des Ödems in dieser Arbeit passen, kann man die Rolle der AQP-4 als einen möglichen Mechanismus in Betracht ziehen (Zador et al., 2009).

## **Ferneffekte des Schlaganfalls**

Zusammen mit der Störung der BHS im ipsiläsionalen Striatum wurden zu dem ersten Zeitpunkt in den T2- gewichteten Bildern Veränderungen nicht nur auf dem ipsilateralen, sondern auch auf dem kontralateralen Striatum gesehen. Solche Ferneffekte wurden bis jetzt nur in den Modellen der permanenten ACM- Okklusion (pACMO) und in dem Modell der Kälteverletzung des Hirns beschrieben. In den Modellen der pACMO war die Ödembildung auf der kontraläsionalen Seite nur 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Okklusion zu sehen (Izumi et al., 2002; O'Brien et al., 1974). Bei dem Kälte-Hirnverletzungs-Modell wurde der Proteinübertritt auf der ipsiläsionalen Seite nach einer Stunde gefunden. Nach 3 Stunden wurde der Übertritt in der kontraläsionalen weißen Substanz und nach 5-6 Stunden in fast der gesamten Hemisphäre gefunden. Nach 24 und 48 Stunden wurde ein deutlicher Protein-Übertritt in den beiden Hemisphären nachgewiesen (Simard et al., 2007). Die Autoren haben diese „routed protein migration“ mit dem „Diaschisis“ Phänomen in Verbindung gebracht. Dieses Postulat könnte hier aus zwei Gründen zutreffend sein: Zum einen ermöglicht die BHS-Funktionsstörung einen Übertritt von Serumproteinen ins geschädigte Hirnareal. Diese Proteine können sich zusammen mit den nach der Nekrose entstandenen Zelldebrityl entlang der Nerven in der weißen Substanz verbreiten. Zum anderen wurde bei vorhandener intakter BHS auf der kontraläsionalen Seite und bei dem Fehlen von ATP-abhängigen Wasserpumpen eine osmotisch getriggerte Verschiebung von Wasser erwartet (Kimmelberg et al., 2004).

Während der Experimente zeigte die kontraläsionale Hemisphäre ständig niedrigere  $SI_{diff}$ -Werte in den T1-gewichteten post-KM-Bildern. Das könnte man mit der

raumfördernden Wirkung der postischämischen Hemisphäre und die in der Folge stattfindende Erhöhung des intrazerebralen Drucks (ICP) und die Erniedrigung des vaskulären kontraläsionalen Volumens erklären. Der gesteigerte ICP kann eine Kompression der kleinsten Gefäße verursachen und so die absolute Konzentration in der „gesunden“ Hemisphäre des Kontrastmittels einschränken. Diese Behauptung kann durch die gleichzeitig erhobenen erniedrigten T2-Werte gestützt werden, die auf ein reduziertes vaskuläres Volumen an oxygeniertem Blut hindeuten.

Die Flusseffekte, die Änderung des Gehalts an Oxy- und Deoxyhämoglobin im Gewebe, der Grad der Gewebeoxygenierung, der Wechsel der Spinmagnetisation zwischen freien und gerichteten Protonen beeinflussen die Relaxationszeiten des Gewebes. Eine Stunde nach Okklusion zeigten die T2-gewichteten Bilder eine Senkung der Intensität, was mit der gesteigerten Deoxyhämoglobin- Konzentration verbunden werden kann (Calamante et al., 1999). Diese Tendenz war im Striatum, im Infarktzentrum und in der relativ unbeschädigten Rinde zu sehen. Dieser Effekt war durch die Okklusion und die so verursachte Verminderung des zerebralen Blutflusses in der ganzen Hemisphäre verursacht (van Dorsten et al., 2002; Longa et al., 1989). Es gibt Gewebe mit sehr hohem O<sub>2</sub>- Verbrauch, das trotz Hypoxie sehr schnell nach Reperfusion regeneriert (Baron et al., 1981; Young et al., 1996). Wie erwartet, sind nach der Reperfusion die transversalen Relaxationszeiten gestiegen, was durch den gesteigerten Blutfluss (Hyperämie) und mit dem Anstieg der Konzentration von oxygeniertem Hämoglobin erklärbar ist. Diese Hyperämiephase beginnt mit einer minimalen Verspätung nach der Reperfusion.

## **Wirkung der wiederholten Anästhesie**

Es ist wichtig zu erwähnen, dass in den post- KM- Bildern der Sham- Tiere und auf der kontralateralen Seite der operierten Tiere eine kontinuierliche Steigerung der  $SI_{diff}$ -Werte zu sehen war. Als Ursache kann man die Wirkung der wiederholten Anästhesie mit Isofluran ansehen. Isofluran scheint eine dosisabhängige Vasodilatation zu induzieren (Hoffman et al., 1991; McPherson et al., 1988). Die wiederholte Isofluranexposition könnte bspw. eine Induktion der endothelialen NO-Synthetase (NOS) hervorrufen und so die Vasodilatation durch NO verursachen (Chiari et al., 2005). Dieser Induktionseffekt des Isofluran auf die NOS ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

Zusammenfassend zeigt die hier vorgelegte Arbeit, dass selbst die Nutzung eines klinischen 3T Kopf-MRT in der experimentellen Schlaganfallforschung interessante pathophysiologische Veränderungen der BHS- Permeabilität und die Entwicklung des Hirnödems nach Okklusion/Reperfusion, wie auch deren zeitlichen Ablauf darstellen lässt. In dieser Arbeit werden deutlich drei Phänomene gezeigt.

1. Die bi-phasische BHS- Permeabilität für Gd- KM korreliert nur teilweise mit der Ödembildung nach Ischämie und deutet auf einen zeitlich unterschiedlichen Verlauf der trans- endothelialen und para- endothelialen Permeabilität.
2. Eine fokale Ischämie führt zu Ödembildung auch in der kontraläsionalen Hemisphäre.
3. Die repetitive Anästhesie hat eine langanhaltende Wirkung auf das zerebrale Endothel und muss bei experimentellen Schlaganfallmodellen mit seriellen Untersuchungen bedacht werden.

Zum Schluss konnte diese Arbeit zeigen, dass Studien mit Kleintiermodellen auch erfolgreich am klinischen MRT mit kleineren Änderungen durchführbar sind und so seriell Monitoren bei verschiedenen therapeutischen Studien z.B. VEGF Therapien, Ionen-Kanale-Blocker u.a. erlaubt und die Zahl der Versuchstiere signifikant senkt.

## 6. Literatur

Abraham CS, Harada N, Deli MA, Niwa M. Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:455-62

Abumiya, T.; Lucero, J.; Heo, J. H.; Tagaya, M.; Koziol, J. A.; Copeland, B. R.; del Zoppo, G. J. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin  $\alpha_v\beta_3$  during focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:1038–1050; 1999

Ahmed GU, Malik AB. Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflugers Arch.* 2005;451:131-142

Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE, and Utepbergenov DI (2001) Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *J Biol Chem* 276:38480–38486

Balabanov, R., Dore-Duffy, P., 1998. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood–brain barrier. *J. Neurosci. Res.* 53, 637–644

Ballabh P, Braun A, and Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1–13. Bandopadhyay R, Orte C, Lawrenson JG, Reid AR, De Silva S, and Allt G (2001)

Baron JC, Boussier MG, Rey A, Guillard A, Comar D, Castaigne P. Reversal of focal “misery-perfusion syndrome” by extra-intracranial arterial bypass in hemodynamic cerebral ischemia: a case study with 15O positron emission tomography. *Stroke.* 1981;12:454–459

Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research* 1996;739:88–96.

Calamante F, Lythgoe MF, Pell GS, Thomas DL, King MD, Busza AL, Sotak CH, Williams SR, Ordidge RJ, Gadian DS. Early Changes in Water Diffusion, Perfusion, T1, and T2 During Focal Cerebral Ischemia in the Rat Studied at 8.5 T. *Magnetic Resonance in Medicine* 1999;41:479–485.

Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase as a Trigger and Mediator of Isoflurane-induced Delayed Preconditioning in Rabbit Myocardium. *Anesthesiology* 2005;103:74–83

Craner MJ, Hains BC, Lo AC, Black JA, Waxman SG. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain* 2004;127:294–303

Croll SD, Wiegand SJ. Vascular growth factors in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 2001; 23:121-3

Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, and Bazzoni G (2000) The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44:743–748.

del Zoppo G.J. (2006) Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 354, 553-555

Dobrogowska, DH, Lossinsky, AS, Tarnawski, M, Vorbrod, AW. (1998) Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *J Neurocytol* 27

Dodson, R. F.; Chu, L. W.; Welch, K. M.; Achar, V. S. Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil: an ultrastructural study. *J. Neurol. Sci.* 33:161– 170; 1977

Eder P, Poteser M, Romanin C, Groschner K. Na<sup>(+)</sup> entry and modulation of Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchange as a key mechanism of TRPC signalling. *Pflugers Arch* 2005;451:99-104

Elfont, R.M., Sundaresan, P.R., Sladek, C.D., 1989. Adrenergic receptors on cerebral microvessels: pericyte contribution. *Am. J. Physiol.* 256, R224–R230

Ehrlich P (1885) *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbeanalytische Studie.* Hirschwald, Berlin

Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, and Gruber K (1988) Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann NY Acad Sci* 529:21–30

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998b) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391-401.

Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998a) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141: 1539-50

Garcia, J. H.; Liu, K.-F.; Ho, K.-L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progress at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 26:636– 643; 1995.

Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H558-68

Goldmann EE (1913) *Vitalfärbung am Zentralnervensystem.* Abhandl. Konig.l Preuss. Akad. der Wiss 1:1–60

Gotoh O, Asano T, Koide T, Takakura K. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. *Stroke* 1985;16:101-9

Groschner K, Rosker C, Lukas M. Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp.* 2004; 258:222–230

Itoh M, Morita K, Tsukita S (1999b) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274: 5981-6.

Izumi Y, Haida M, Hata T, Isozumi K, Kurita D, Shinohara Y. Distribution of brain oedema in the contralateral hemisphere after cerebral infarction: repeated MRI measurement in the rat. *Journal of Clinical Neuroscience* 2002;9:289-293

Haseloff R. F., Blasig I. E., Bauer H. C. and Bauer H. (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25, 25-39

Hatashita S, Hoff JT: Biomechanics of brain edema in acute cerebral ischemia in cats. *Stroke* 1988;19:91-97

Hatashita S, Hoff JT. Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1990;21:582-588

Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood–brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharm Rev* 57:173–185

Hellstrom, M, Gerhardt, H, Kalen, M, Li, X, Eriksson, U, Wolburg, H, Betsholtz, C. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153: 543-553

Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39:51-70

Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110: 1603-13

Hirschi, K.K., D'Amore, P.A., 1997. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* 79, 419–428

Hoffman WE, Edelman G, Kochs E, Werner C, Segil L, Albrecht RF. Cerebral autoregulation in awake versus isoflurane-anesthetized rats. *Anesth Analg* 1991;73:753–7

Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* 1999;26:298–304

Jeffrey L. Saver, Jeffrey Gornbein, James Grotta, David Liebeskind, Helmi Lutsep, Lee Schwamm, Phillip Scott and Sidney Starkman. Number Needed to Treat to Benefit and to Harm for Intravenous Tissue Plasminogen Activator Therapy in the 3- to 4,5- Hour Window: Joint Outcome Table Analysis of the ECASS 3 Trial. *Stroke* 2009; 40; 2433-2437

Kimelberg HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 2004;129:851-60

Klatzo I: Concepts of ischemic injury associated with brain edema, in Inaba K, Klatzo I, Spatz M (eds): Brain Edema. Tokyo, Springer-Verlag, 1985,1-5

Kniesel U and Wolburg H (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20:57–76.

Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The Biphasic Opening of the Blood-Brain Barrier to Proteins Following Temporary Middle Cerebral Artery Occlusion. *Acta Neuropathol (Berl)* 1985;68:122-129

Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 2004;56:468-77

Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow C, van Breemen C. Relationship between the sarcoplasmic reticulum and the plasma membrane. *Novartis Found Symp* 2002;246:26–41

Lewandowsky M (1900) Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. *Z Klin Med* 40:480–494

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91

Meyer TN, Schwesinger C, Ye J, Denker BM, Nigam SK. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. *J Biol Chem.* 2001; 276:22048-55

O'Brien MD, Waltz AG, Jordan MM. Ischemic cerebral oedema. Distribution of water in brains of cats after occlusion of the middle cerebral artery. *Arch Neurol* 1974;30:456–460

Oldendorf WH, Cornford ME, and Brown WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409–417

Dr. med. Olivia Pohlers; Praktikabilität und prognostische Wertigkeit der Diffusions- und Perfusions-Magnetresonanztomographie bei der akuten zerebralen Ischämie 03.02.2005

Paltauf-Doburzynska J, Frieden M, Spitaler M, Graier WF. Histamine-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in a human endothelial cell line depend on transmembrane ion flux, ryanodine receptors and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Physiol* 2000;524:701–713

Pantoni, L.; Garcia, J. H.; Gutierrez, J. A.; Rosenblum, W. I. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke* 27:1641–1647; 1996

Pardridge, W.M. Introduction to the Blood–Brain Barrier. Methodology, Biology and Pathology, Cambridge University Press, Cambridge (1998)

Ringel F; Chang R.C; Staub,F; Baethmann A; Plesnila,N Contribution of anion transports to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells. *J. Neurochem.* 75:125-132; 2000

Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2008; 32:200-19

Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999) Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 11-9.

Sedlakova R, Shivers RR, and Del Maestro RF (1999) Ultrastructure of the bloodbrain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:149–161

Semenza, GL. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19: 176-182

Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 2007;6:258-68.

Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:593-60

Stewart P. A. and Wiley M. J. (1981) Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail–chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84, 183-192

Spratt NJ, Fernandez J, Chen M, Rewell S, Cox S, van Raay L, Hogan L, Howell DW. Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2006;155:285–290

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissueplasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581–1587

Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:697-709

Young AR, Sette G, Touzani O, Rioux P, Derlon JM, MacKenzie ET, Baron JC. Relationships between High Oxygen Extraction Fraction in the Acute Stage and Final Infarction in Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion: An Investigation in Anesthetized Baboons with Positron Emission Tomography. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1996; 16,1176–1188.

van Dorsten FA, Ola'h L, Schwindt W, Grune M, Uhlenkuken U, Pillekamp F, Hossmann KA, Hoehn M. Dynamic Changes of ADC, Perfusion, and NMR Relaxation Parameters in Transient Focal Ischemia of Rat Brain. *Magnetic Resonance in Medicine* 2002;47:97–104

Wang CX, Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog. Neuro biol.* 2007; 83:140–148.

Werner Hacke, M.D., Markku Kaste, M.D., Erich Bluhmki, Ph.D., Miroslav Brozeman, M.D., Antoni Davalos, M.D., Donata Guidetti, M.D., Vincent Larrue, M.D., Kennedy R. Lees, M.D. Zakaria Megdeghri, M.D., Thomas Maching, M.D., Dietmar Schneider, M.D., Ruediger von Kummer, M.D., Nils Wahlgren, M.D., and Danilo Toni M.D., for ECASS Investigators Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke, *N Engl J Med* 2008;359:1317-29.

Wolf, P. A., J. L. Cobb, R. B. D'Agostino (1992): Epidemiology of stroke. In: Barnett, H. J. M., J. P. Mohr, B. M. Stein, F. M. Yatsu: *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Churchill Livingstone, New York, 3–27

Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;190:159–170.

Zonta M et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6 (2003), pp. 43-50