

5 Zusammenfassung

Trotz Fortschritten in der operativen Versorgung von Patienten mit aneurysmatischer Subarachnoidalblutung geht dieses Krankheitsbild nach wie vor mit einer hohen Letalität und Morbidität einher. Ursache ist die initiale Hirnschädigung, welche im wesentlichen durch einen Hirndruckanstieg mit konsekutiver globaler cerebraler Ischämie hervorgerufen wird. Bis heute steht keine wirkungsvolle Pharmakotherapie zur Verfügung. Deren Entwicklung setzt voraus, daß Tiermodelle für pharmakologische Prüfungen vorhanden sind, bei denen reproduzierbar definierte Hirnschäden erzeugt werden und die eine ausreichende Nähe zur klinischen Situation aufweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines neuen Tiermodells, in dem es zu akut nach experimenteller Subarachnoidalblutung auftretenden ischämischen Zellschäden kommt.

Ausgehend vom intracraniellen Druckverlauf bei Patienten während aneurysmatischer Subarachnoidalblutung wurde für die Ratte ein Infusionsmodell entwickelt, welches den Hirndruckanstieg experimentell reproduziert. Hierzu wurde eine computergesteuerte Infusion von autologem Blut in die Cisterna magna oder Cisterna olfactorii über 5-7 Minuten durchgeführt. In Kontrollgruppen wurde entweder nur ein cisternaler Katheter implantiert oder eine computergesteuerte Infusion von NaCl-Lösung durchgeführt.

Nach 3 Tagen wurde ein neurologisches Scoring und nach 7 Tagen eine Gewichtskontrolle der Tiere durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben folgende statistisch signifikante Veränderungen bei Ratten nach experimenteller Subarachnoidalblutung gegenüber scheinoperierten Tieren: Reduktion des Körpergewichtes, eingeschränkte Motorik und Beeinträchtigung der Bewußteinslage.

Nach sieben Tagen wurde eine histologische Untersuchung der Hippocampusregionen mittels konventioneller histologischer Färbemethoden vorgenommen. Es zeigten sich nach Infusion von Blut bei 10% der Tiere Zellschäden von mehr als 50% der Neurone, wohingegen nur bei einer von sechs untersuchten Ratten nach Infusion von NaCl-Lösung Läsionen (10%) klar

erkennbar waren. Allerdings war die Streuungsrate innerhalb der einzelnen Gruppen so groß, daß sich hier keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben.

Die immunhistochemische Untersuchung des Expressionsverhaltens des "heat shock proteins" HSP70 gilt als sensitiver Indikator neuronaler Zellschädigung. Dieses Protein wird unter Normalbedingungen nicht exprimiert.

Nach Blutinfusion fand sich eine signifikante HSP70-Expression in unterschiedlichen anatomischen Regionen bereits am 1. Tag nach der Blutung. Der Befund war über den Untersuchungszeitraum von 5 Tagen konstant. Entsprechend dem Konzept der selektiven Vulnerabilität zeigte sich ein besonders hoher Anteil immunpositiver Zellen im CA1-Sektor und im Gyrus dentatus des Hippocampus, während resistenter Hirnareale wie der CA3-Sektor nahezu keine Streßproteininduktion zeigten. Nach NaCl-Infusion konnte eine entsprechende HSP70-Expression gezeigt werden, welche allerdings im Vergleich zur Blutinfusion schwächer ausgeprägt war und verzögert mit einem Maximum am 5. Tag auftrat. Der Vergleich der Infusionsorte (Cisterna magna versus olfactorii) ergab für den Anteil immunpositiver Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Letztlich erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen die HSP70-Methodik in Kombination mit konventionellen histologischen Färbemethoden ein ausreichend sensitiver und gleichzeitig robuster Parameter nach SAB zu sein, welcher gezielte pharmakologische Studien nach experimenteller SAB zuläßt.

6 Summary

Heike Beck

A small animal model for the investigation of acute cerebral ischemia after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat.

Despite progress in the surgical treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage, these patients still show a high morbidity and lethality. This is caused by the primary brain damage, mainly due to an increased intracranial pressure (ICP) leading to a global cerebral ischemia. However up to now there is no effective pharmacological treatment available. The development of such a drug requires an animal model producing defined lesions and also resembling the clinical situation in man.

Therefore, the aim of this study was first to develop a new animal model of experimental non-traumatic subarachnoid hemorrhage and second to characterize the acute ischemic cell damage.

Using data from ICP-recordings of patients during secondary subarachnoid hemorrhage caused by a ruptured cerebral aneurysm, we developed an infusion-model in the rat reproducing the bleeding-induced ICP-increase experimentally. Therefore autologous blood was injected into the cistern magna or cisterna olfactorii over 5-7 minutes using a computer-controlled pumping-device. Animals in control groups received a cisternal catheter only or were treated with NaCl 0,9% instead of blood.

Neurological scoring was performed on day 3 and animals were checked for body weight at 7 days after trauma / sham operation. The rats showed statistical significant impairment after experimental subarachnoid hemorrhage in the items motor activity and consciousness and also the body weight was significantly reduced.

Brains were subjected to conventional histological staining 7 days after the trauma / sham operation. This revealed more than 50% damaged hippocampal neurons in 10% of the animals injected with blood, whereas lesions were clearly visible (10% damaged neurons) only in one

of six rats after injection of NaCl 0,9%. However, there was no statistical significant difference, due to the high variances within the groups.

The heat shock protein (HSP70) is not found in the brain under normal conditions, however, it is a sensitive marker of neuronal damage. The expression of HSP70 was significantly increased in different anatomical regions already one day following the injection of blood and remained constantly high during the whole study period. According to their concept of "selective vulnerability" an especially high number of immunoreactive neurons was found in the hippocampal CA1-region and in the dentate gyrus, whereas the more resistant areas (e.g. CA3) showed nearly no HSP70-expression.

The findings were similar following injection of NaCl 0,9%, although the intensity was less compared with blood and the maximal staining appeared only at day 5. A comparison between injection into cisterna magna and cisterna olfactorii, respectively, did not reveal any difference.

In conclusion, these results show that this new experimental animal model in combination with conventional histology and immunohistochemistry for HSP70 is a useful tool to investigate the therapeutic potential of new drugs for the treatment of non-traumatic subarachnoid hemorrhage.