

6. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz erheblicher Fortschritte im Bereich der Herz- und Thoraxchirurgie stellen postoperative Störungen des zentralen Nervensystems ein ernstzunehmendes Problem dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein tierexperimentelles Modell zur globalen cerebralen Ischämie zu etablieren, welches es ermöglicht, pathophysiologische und pharmakologische Studien zur globalen cerebralen Ischämie durchzuführen. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der aus klinischer Sicht besonders interessanten Kombination von histopathologischen und verhaltensbiologischen Untersuchungen gewidmet.

Eingesetzt wurde das globale cerebrale Ischämie-Modell der Maus (C57BL/6) mit transients bilateraler A. carotis communis Okklusion (BCCAO, 2VO).

In dem ersten Teil der Versuchsdurchführung erfolgte die Evaluierung des cerebralen Ischämie-Modells anhand 6 Versuchsgruppen (Kontroll-, Scheinoperierten-, 2-, 5-, 10- und 15 min. Ischämiegruppe) nach einer 24stündigen Reperfusionphase mittels histologischer (H.E.) und immunhistologischer (ICAM-1) Untersuchung der Gehirne.

Die histologische Untersuchung ergab eine positive Korrelation zwischen der Dauer der Ischämie und der Zunahme des neuronalen Zellschadens. Während bei der Kontroll- und Scheinoperiertengruppe, ebenso wie bei den Tieren nach 2minütiger cerebraler Ischämie kein neuronaler Zellschaden festgestellt werden konnte, zeigten 50% der Tiere nach 5minütiger Okklusion eine neuronale Zellschädigung, die besonders deutlich im Bereich des Neocortex ausgebildet war. Mit Erhöhung der Okklusionsdauer auf 10 bzw. 15 Minuten konnte bei 100% der Tiere ein neuronaler Zelluntergang von zunehmender Intensität beobachtet werden, der sich auf große Teile des Cortex, des Hippocampus (besonders CA1 und Gyrus dentatus) und des Thalamus ausdehnte.

Die immunhistologische Untersuchung der ICAM-1 Expression, diente als Indikator für ischämiebedingte endotheliale Reaktionen, die leukozytäre Interaktionen vermitteln und eine bedeutende Rolle am postischämischen Schaden einnehmen. Zwischen den einzelnen Untergruppen konnte mit verlängerter Okklusionszeit eine Zunahme der ICAM-1 Expression

besonders im Bereich des Cortex und Hippocampus, aber auch des Di- und Mesencephalons beobachtet werden. Dabei stieg sowohl der prozentuale Anteil der Tiere mit vermehrter ICAM-1 Expression, als auch die Menge der ICAM-1 Expression nach 10- und 15minütiger Ischämie signifikant an.

Der zweite Teil der Arbeit diente der Untersuchung kognitiver und sensomotorischer Veränderungen nach globaler cerebraler Ischämie. Dazu wurden eine Kontroll- und Scheinoperiertengruppe, sowie eine 5- und 10minütige Ischämiegruppe über einen insgesamt 18tägigen Zeitraum einer Serie von Verhaltenstests (Holeboard, Elevated plus-maze, Rotarod, Morris water maze) unterzogen. Zusätzlich wurde die postoperative Aufwachphase überwacht und das Allgemeinbefinden sowie der neurologische Status 5 und 24 Stunden p.o. bestimmt. Am Ende der 18tägigen Versuchsdauer erfolgte eine histologische Untersuchung (H.E.) der Gehirne.

Bei den Tieren nach 5- und 10minütiger Okklusionsdauer konnte eine verlängerte postoperative Schlafphase, sowie eine Zunahme neurologischer Defizite in Verbindung mit einer Störung des Allgemeinbefindens innerhalb der ersten 24 Stunden postoperativ beobachtet werden. Bei der 10minütigen Ischämiegruppe konnte darüberhinaus eine deutliche Abnahme der postschämischen Überlebensrate im Vergleich zu den übrigen Untergruppen festgestellt werden. Während der ersten 5 Versuchstage konnten signifikante Unterschiede zwischen der 5- und 10minütigen Ischämiegruppe zu der Kontroll- und Scheinoperiertengruppe beobachtet werden, während bei der erneuten Testung 7 Tage später (13.-17. Tag p.o.) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden konnten. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der durchgeführten Verhaltenstests auf reversible Defizite kognitiver und sensomotorischer Fähigkeiten der Mäuse nach 5- und 10minütigen BCCAO hin.

Im Rahmen der histologischen Untersuchung konnte lediglich bei 18% der Mäuse nach 5- und bei 55% der Mäuse nach 10minütiger Ischämie ein neuronaler Schaden histologisch aufgezeigt werden. Dabei konzentrierte sich der neuronale Schaden auf Teile des Neocortex sowie die CA1 Region und den Gyrus dentatus des Hippocampus.

Die transiente BCCAO bei C57BL/6 Mäusen erwies sich als einfaches und gleichzeitig zuverlässiges globales cerebrales Ischämie Modell. Dabei konnte eine Korrelation zwischen

histopathologischen und verhaltensneurologischen Parametern aufgezeigt werden, deren Kombination die klinische Relevanz des Modells erhöht und im Rahmen therapeutischer Studien sinnvoll erscheint.

SUMMARY

Olaf Hülsmann

Histopathological and neurobehavioural studies following transient global cerebral ischemia in a mouse model (C57BL/6)

Despite major advances in cardiac surgery, postoperative dysfunction of the central nervous system still remains a major problem after this type of surgery.

The aim of this study was to establish an experimental animal model for investigation of global cerebral ischemia. Such a model should allow insight into pathophysiological mechanisms as well as pharmacological interventions with potential clinical application. We therefore validated and correlated histopathological techniques and results with neurobehavioral studies and neurological outcome in a mouse model.

The present study was undertaken in C57BL/6 mice. Transient global cerebral ischemia was induced by bilateral common carotid occlusion (BCCAO, 2VO).

In a first part of this experiment mice were divided into six experimental groups (control, sham operation, 2-, 5-, 10- and 15 min BCCAO). For histopathological evaluation brains in all groups were fixed 24 h after reperfusion and stained for histopathological (H.E.) and immunohistochemical (ICAM-1) analysis.

A positive correlation between the duration of ischemia and an increasing neuronal cell damage could be demonstrated. In control and sham animals as well as in mice after 2 min of BCCAO, no evidence of neuronal cell damage was found. However, after 5 min of occlusion 50% of mice developed selective neuronal death, especially in the neocortex. By increasing occlusion time to 10 and 15 min, respectively, all animals showed neuronal cell death in all major cerebral regions including cortex, hippocampus (especially CA1 and gyrus dentatus) and thalamus.

Due to the influence of ICAM-1 mediated leukocyte-endothelial-interactions on postischemic tissue damage, immunohistochemical staining for ICAM-1 was used to visualize the endothelial expression of this adhesion molecule. With increased occlusion time, experimental groups demonstrated progressive ICAM-1 expression particularly in the cortex, hippocampus and in the di- and mesencephalon. We observed a significantly higher number of mice with ICAM-1 expression as well as an increased quantity of ICAM-1 expression after 10- and 15 min of cerebral ischemia.

In the second part of the study cognitive and sensomotoric dysfunction in the same model of global cerebral ischemia was studied. Mice (control, sham, 5 and 10 min BCCAO) were followed in a neurobehavioural test battery (holeboard, elevated plus-maze, rotarod, Morris water maze) for a period of 18 days after ischemia. Additionally, the mice were assessed for 2 hours during the postoperative recovery. Furthermore, the general state of health as well as neurological dysfunction was assessed 5 and 24 hours after ischemia. At the end of the 18 days test period brains were fixated and stained (H.E.).

Animals of the 5 and 10 min BCCAO groups showed an increased postoperative sleeping time and neurological deficits as well as a deterioration of the general state of health during the first 24 hours postoperatively. In comparison to the other groups there was a noticeable decrease in survival rate in animals with 10 min BCCAO.

Only during the first 5 days (day 1 to 5 p.o.) significant differences were observed between the ischemic (5 and 10 min BCCAO) and the non-ischemic groups. Seven days later (day 13 to 17 p.o.) no significant differences in behavior were determined. These data suggest that 5 and 10 min BCCAO lead to reversible cognitive and sensomotoric deficits in C57BL/6 mouse.

In 18% of the mice with 5 min BCCAO and in 55% after 10 min BCCAO, a mild neuronal cell death was found primarily in the neocortex and hippocampus (CA1 and gyrus dentatus).

In summary, our results reveal that transient BCCAO in C57BL/6 mice is a simple and reliable method to produce a global cerebral ischemia. Histopathological and neurobehavioural studies correlate well and are useful to be assessed in combination in order to improve clinical relevance of future interventional studies.