

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. FR. BAUER)

**Über Dosis-Wirkungsbeziehungen
bei dem durch Pentamethylentetrazol („Cardiazol“)
induzierten Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke
unter Verwendung von Geigyblau als Schrankenindicator**

Von
K. FR. BAUER, J. HAASE und H. LEONHARDT

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 1. Juni 1956)

Über das Problem der Blut-Gehirnschranke orientieren folgende zusammenfassende Darstellungen: K. FR. BAUER (1953); BROMAN (1949); KAFKA (1934); LEONHARDT (1952); WALTER (1934); SPATZ (1934).

Frühere Untersuchungen haben ergeben, daß 1. im Cardiazolkampf die Blut-Gehirnschranke für Geigyblau als einem Indicator feinerer Schrankenläsionen durchlässig wird [K. FR. BAUER u. H. LEONHARDT (1955)], und daß 2. die Schrankenwirkung des Cardiazols durch Megaphen aufgehoben werden kann [K. FR. BAUER u. H. LEONHARDT (1956)]. In Erweiterung dieser Arbeiten stellten wir uns bei den vorliegenden Experimenten folgende Fragen:

1. Besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen verschiedenen Cardiazoldosen und dem Grade der Blaufärbung bestimmter Gehirnteile durch Geigyblau?

2. Läßt sich eine den Schrankenzusammenbruch induzierende Cardiazol-Schwellendosis ermitteln?

Methode

Die Versuche führten wir an 32 ♂ Kaninchen im Gewicht von 1800—2700 g durch. Jedem der Tiere wurden 10 cm³/kg einer 1%igen wäßrigen Geigyblaulösung (= 100 mg/kg) i.v. injiziert. 20 min später, nachdem der Farbstoffausgleich zwischen Blut und Gewebe eingetreten ist, erfolgte die rasche i.v. Cardiazolinjektion. Nach weiteren 25 min durchspülten wir von der Aorta aus die Tiere in Äthernarkose mit etwa 140 cm³ einer physiologischen Kochsalzlösung und anschließend, zur Fixierung, mit etwa 40 cm³ des Carnoyschen Gemisches. Die gesamte Durchspülung dauerte etwa 10 min. Sie bezweckt, den im Gehirn vorhandenen Farbstoff bei makroskopischer Betrachtung zur Beurteilung zu bringen und eine Beeinflussung des Färbegrades aus dem in den Blutgefäßen vorhandenen Farbstoff auszuschließen. Das Resultat der Durchspülung wurde am histologischen Schnitt kontrolliert. Die Frage, ob der Äthernarkose für den Farbstoffdurchtritt im cardiazol-induzierten Schrankenzusammenbruch eine Bedeutung zukommt, muß vorläufig offen bleiben.

Nach Präparation des Gehirnes legten wir einen Frontalschnitt im Gebiet des Zwischenhirnes durch das Tuber cinereum und einen medianen Sagittalschnitt durch Kleinhirn und Rautengrube (Abb. 1). Um den Grad der Blaufärbung der betreffenden Gehirnschnitte zu bestimmen, wurden diese, bedeckt von einer Glasplatte, bei auffallendem Kunstlicht mit halbtransparenten Kunststofffolien gleichmäßiger Dicke soweit abgedeckt, bis die gefärbten von den ungefärbten Gehirnteilen nicht mehr zu unterscheiden waren. Die Zahl der benötigten Folien ergab den „*Blauwert*“ des jeweiligen Schnittes. Die Summe der drei Einzelwerte aus drei Gehirnschnitten (Zwischenhirn mit Temporalhirn, Rautenhirn und Kleinhirn) stellt den „*Blauwert*“ eines ganzen Gehirns dar. Mit diesem Meßverfahren wird lediglich die Farbstoffintensität erfaßt. Eine Aussage über die Farbstoffkonzentration ist nicht möglich, da in den Messungen weder die Fläche noch die Schnittdicke berücksichtigt worden sind. Die Empfindlichkeit dieser „Transparenzmethode“ ist groß genug, um die in den Untersuchungen festgestellten Gradunterschiede zahlenmäßig zu bestimmen. Wir haben an Filtrerpapieren, die mit Geigyblaulösungen bekannter Konzentrationen angefärbt worden sind, in dem uns interessierenden Meßbereich Konzentrationsunterschiede von einer Zehnerpotenz sicher nachweisen können.

Ergebnisse und Diskussion

Kontrolltiere, die 100 mg/kg Geigyblau, aber kein Cardiazol erhalten hatten, zeigten keine Anfärbung des Gehirnes, mit Ausnahme der wenigen Stellen, die unter physiologischen Verhältnissen immer eine durchlässige Blut-Gehirnschranke aufweisen (Neurohypophyse, Hypophysenstiel, Tuber cinereum, Area postrema, Plexus chorioidei, Epiphyse und subfornikales Organ).

Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren überein [Lit. s. LEONHARDT (1952)]. Dort wurde auch Literatur über pathologische Schrankendurchlässigkeit zitiert.)

Wir haben in einer früheren Arbeit [K. FR. BAUER u. H. LEONHARDT (1955)] Abbildungen über

die Verteilung des nach Cardiazolkrampf ins Gehirn eingedrungenen Farbstoffes gebracht. Hier sei nur wiederholt, daß sich der Farbstoff (Geigyblau) vorwiegend im Zwischenhirnbereich, im Temporalhirn, dem dorsalen Abschnitt des Kleinhirnwurmes und im Rautenhirn findet (vgl. auch Abb. 1!).

1. *Dosis-Wirkungsbeziehungen beim Schrankenzusammenbruch nach Cardiazolinjektion:* Wir haben in zwei Versuchsgruppen die Wirkung von 20 und 40 mg/kg Cardiazol auf den Schrankenzusammenbruch und den damit verbundenen Übertritt von Geigyblau in den genannten drei repräsentativen Gehirnschnitten untersucht. Jede Versuchsgruppe umfaßte 5 Kaninchen.

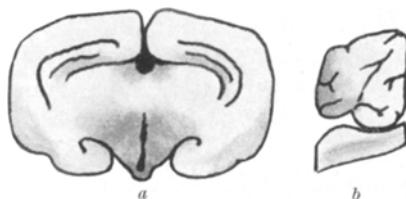


Abb. 1. *a* Frontalschnitt durch Zwischenhirn und Tuber cinereum, *b* Medianer Sagittalschnitt durch Rautenhirn und Kleinhirnwurm. In den Schnitten ist durch Tönung die typische Verteilung der Blaufärbung des Gehirns bei durchlässiger Blut-Gehirnschranke (Schrankenzusammenbruch) dargestellt

Nach intravenöser Injektion von 20 mg/kg Cardiazol ergibt sich für 5 Tiere ein mittlerer Blauwert von 13,4. Hingegen beträgt der mittlere Blauwert im Gehirn derjenigen Tiere, die 40 mg/kg Cardiazol erhielten, 19,4 (s. Tabelle 1). Die Differenz $6,08 \pm 2,03$ ist signifikant ($P < 0,05$).

Es liegt die Frage nahe, ob nach intravenöser Injektion von 20 mg/kg und 40 mg/kg Cardiazol die *einzelnen* Gehirnschnitte unterschiedlich angefärbt sind. Dabei wären zwei Möglichkeiten gegeben: 1. Es kann

Tabelle 1

| | Cardiazoldosis | |
|--|----------------|----------------|
| | 20 mg/kg | 40 mg/kg |
| 1. Anzahl der untersuchten Tiere | 5 | 5 |
| 2. Mittl. Blauwert | 13,4 | 19,4 |
| 3. Differenz der Mittelwerte und mittlere Abweichung vom Mittelwert. | | $6,0 \pm 2,03$ |
| 4. P. | | $<0,05$ |

die höhere bzw. niedrigere Farbstoffintensität in Abhängigkeit von der Cardiazoldosierung jeden der Einzelschnitte betreffen. 2. Der Farbstoff-Intensitätsunterschied kann darauf beruhen, daß sich bestimmte Gehirnteile häufiger (nach 40 mg/kg) oder seltener (nach 20 mg/kg Cardiazol) anfärbten. Aus unseren Beobachtungen geht nun hervor, daß sich nach einer Injektion von 40 mg/kg Cardiazol das Zwißchenhirn mit den Temporallappen, der dorsale Kleinhirnwurm und das Rautenhirn bei *allen* Versuchstieren angefärbt haben. Bei Gaben von 20 mg/kg Cardiazol dagegen zeigen 2 von 5 Versuchstieren *keine* Anfärbung des dorsalen Kleinhirnwurmes. Ferner ergibt ein Vergleich der mittleren Blauwerte der einzelnen Gehirnteile, daß die Zunahme der Farbstoffintensität bei der höheren Cardiazoldosierung wahrscheinlich auf eine stärkere Anfärbung des dorsalen Kleinhirnwurmes zurückzuführen ist: Der mittlere Blauwert dieses Gehirnteils beträgt 3,6 nach Verabreichung von 20 mg/kg Cardiazol, hingegen 7,0 bei Injektion von 40 mg/kg Cardiazol. Die Zufallswahrscheinlichkeit der Differenz von $3,4 \pm 1,66$ ist größer als 5%. Es wäre also wünschenswert, anhand einer größeren Tieranzahl zu prüfen, ob dieser Unterschied signifikant wird. Ebenso deutet sich ein unterschiedlicher Anfärbungsgrad im Gebiet des Rautenhirns für die beiden Versuchskollektive an: der mittlere Blauwert nach Injektion von 20 mg/kg Cardiazol beträgt 4,4, nach 40 mg/kg Cardiazol jedoch 6,0. Im Zwißchenhirngebiet läßt sich ein wesentlicher Unterschied in der Farbstoffintensität nach Injektion von 20 mg/kg und 40 mg/kg Cardiazol nicht feststellen: die mittleren Blauwerte betragen 5,4 und 6,4. Die

Differenz ist gering, die mittlere Abweichung vom Mittelwert hingegen erheblich, so daß auch bei Untersuchungen größerer Tierkollektive kein signifikanter Unterschied im Anfärbungsgrad erwartet werden kann.

2. Versuche zur Ermittlung einer Cardiazol-Schwellendosis für den Schrankenzusammenbruch. Die Frage, ob der Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke im Cardiazolkrampf an eine Cardiazol-Schwellendosis gebunden ist, untersuchten wir, indem die Wirkung der Cardiazoldosen von 10, 15 und 17 mg/kg auf den Durchtritt von Geigyblau durch die Blut-Gehirnschranke geprüft wurde. Diese Dosen entsprechen etwa jenen, durch die Cardiazolkrämpfe ausgelöst werden können [Lit. s. „Cardiazol-Monographie“ (1951)]. Ebenso wie die Cardiazolkrampf-Schwellendosis abhängig von der Art der untersuchten Tiere, ihrem Alter und jahreszeitlichen Einflüssen variiert, ließ sich auch eine bestimmte Cardiazoldosis als Schwellendosis für den Schrankenzusammenbruch nicht ermitteln. Allerdings untersuchten wir nur verhältnismäßig wenige Tiere. Wir fanden immerhin, daß Cardiazoldosen unter 20 mg/kg seltener zu einem Schrankenzusammenbruch führen: bei 7 Tieren, die weniger als 20 mg/kg Cardiazol erhalten hatten, sahen wir dreimal eine Anfärbung des Gehirns. Cardiazoldosen von 20, 40, 50 und 80 mg/kg führten dagegen bei 12 von 14 Tieren zum Schrankenzusammenbruch. Der Unterschied zwischen der Anfärbungshäufigkeit der Gehirne von Tieren, die mehr als 20 mg/kg Cardiazol erhalten hatten, und solchen, die weniger als 20 mg/kg Cardiazol erhalten hatten, ist signifikant ($P < 0,05$). Es erscheint berechtigt anzunehmen, daß die den Schrankenzusammenbruch induzierende Cardiazol-Schwellendosis zwischen 10 und 17 mg/kg Cardiazol liegt. Um die Frage nach einer den Schrankenzusammenbruch auslösenden Schwellendosis weiter zu klären, wäre es wünschenswert, eine größere Anzahl von Tieren möglichst isogener Konstitution zu untersuchen.

Die Beobachtung, daß Megaphen den Schrankenzusammenbruch im Cardiazol-krampf verhindern kann (K. FR. BAUER u. H. LEONHARDT, 1956), läßt sich durch folgende Versuche ergänzen. Wir prüften die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Schrankendurchlässigkeit im Cardiazolkrampf. 20 min nach der Verabreichung des Farbstoffes injizierten wir 50 mg/kg „Cebion“ (Merck). Die Tiere erhielten 7, 15 und 25 min später 20 mg/kg Cardiazol i.v. Die Anfärbung der Gehirnschnitte mit Geigyblau war deutlich geringer als bei Kontrolltieren, die ebenfalls 20 mg/kg Cardiazol, aber kein Cebion erhalten hatten. Bei einem Tier blieb die Blut-Gehirnschranke überhaupt intakt. Bei Injektion von 50 mg/kg Cardiazol nach vorhergehender Gabe von 50 mg/kg Cebion zeigte sich kein Unterschied gegenüber Kontrolltieren. Ascorbinsäure beeinflußt also die Permeabilität der Blut-Gehirnschranke deutlich bei niedriger Cardiazoldosierung. Dieses Ergebnis überraschte insofern nicht, als die permeabilitätshemmende Wirkung der Ascorbinsäure bekannt ist. Es ergibt sich, daß die Auslösung eines Cardiazolkrampfes nicht immer zum Schrankenzusammenbruch führt. Der Schrankenzusammenbruch kann ausbleiben infolge einer unterschwelligen Cardiazoldosis oder nach Megaphen- bzw. Ascorbinsäureinjektionen. Zur weiteren Abklärung der Frage, inwieweit allgemein ein Kausalzusammenhang zwischen zentralnervöser Übererregung und Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke

besteht, haben wir außerdem Versuche über die Wirkung von Pikrotoxin und Strychnin bereits in Angriff genommen.

Wir haben die naheliegende Vermutung, daß sich der bekannte Antagonismus zwischen Barbituraten und Cardiazol auch auf die Schrankenwirksamkeit des Analeptikums erstrecken müsse, experimentell geprüft. Eine Dosis von 40 mg/kg Butyl- β -bromallylbarbitursaures Natrium („Pernocton“) bewirkte nach i.v. Injektion beim Kaninchen tiefe Narkose (Seitenlänge). Die nachfolgende Injektion von 40 mg/kg Cardiazol durchbrach zwar innerhalb weniger Sekunden die Narkose, rief aber keinen Schrankenzusammenbruch hervor. Auf die Untersuchung anderer Barbiturate, vor allem unter dem Gesichtspunkte der Anwendung von Hirnstamm- und Rindennarkotica wurde vorläufig verzichtet.

Zwei weitere Beobachtungen über intakt gebliebene Blut-Gehirnschranke nach Cardiazolinjektion halten wir für erwähnenswert. Zu einem Farbstoffübertritt kam es nicht, wenn 40 mg/kg Cardiazol *fraktioniert* gespritzt wurden: die erste Teildosis betrug 10 mg/kg Cardiazol und führte zu keinem Krampfausbruch. In Abständen von 10 min wurden je 5 mg/kg Cardiazol bis zur Gesamtdosis von 40 mg/kg injiziert, ohne daß ein Krampf auftrat. Zu einem nennenswerten Abbau der Gesamtdosis ist es innerhalb der Versuchsdauer von 60 min wahrscheinlich nicht gekommen (vgl. die Literatur über den Cardiazolabbau in „Cardiazol-Monographie“, 1951). Die *rasche einmalige Injektion* einer für den Cardiazolkrampf überschwelligen Dosis ist demnach eine Voraussetzung für den Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke.

Eine weitere Vorbedingung für den Farbstoffübertritt ins Gehirn ergab sich aus der Beobachtung, daß zwischen der Cardiazolinjektion und dem Nachweis von Geigyblau im Gehirn eine Mindestversuchsdauer eingehalten werden muß. 3 min nach Injektion von 80 mg/kg Cardiazol fand sich keine Anfärbung des Gehirns. Wir haben früher (K. FR. BAUER u. H. LEONHARDT, 1955) darauf hingewiesen, daß der cardiazolinduzierte Schrankenzusammenbruch etwa 15 min anhält und reversibel ist. Aus dem hier mitgeteilten Befunde ergibt sich zusätzlich, daß die Schranke erst nach einer Latenzzeit für Geigyblau durchlässig wird: während die zentralnervöse Wirkung des Cardiazols, der Krampf, wenige Sekunden nach der i.v. Injektion ausbricht, vergehen bis zur Manifestation des Schrankenzusammenbruchs (Blaufärbung) mehr als 3 min. Hierin sehen wir einen Hinweis darauf, daß im Schrankenzusammenbruch gewebliche Veränderungen vor sich gehen, die Zeit erfordern.

In diesem Sinne interpretieren wir ferner die Beobachtung, daß bei chronischen Entzündungen in peripheren Körperteilen ein Schrankenzusammenbruch durch Cardiazol nicht induziert werden konnte. Unter der Voraussetzung, daß dem Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke gewebliche Strukturveränderungen zugrunde liegen (H. LEONHARDT, 1952), halten wir es für denkbar, daß diese von der Stoffwechselsituation der Gewebe allgemein, also auch von allergischen Zuständen mitbestimmt werden kann.

In der Absicht, die Cardiazolwirkung auf Cytoplasma genauer kennenzulernen, wandten wir uns einfacheren Objekten zu. Untersuchungen über die Wirkung von Cardiazol auf das Wachstum von Warmblütlergewebe in der Kultur sowie Untersuchungen über den Cardiazoleffekt auf die Bewegung der Kinocilien der Rachenschleimhaut des Frosches wurden begonnen. Ohne späteren Ergebnissen vorzugreifen, läßt sich jetzt schon sagen, daß die Kinocilien der Froschschleimhaut in einem 0,1%igen Cardiazolmilieu bis zu 5 Tagen schlagen, wohingegen die Kontrollen ohne Cardiazol bereits innerhalb des ersten Tages ihre Flimmerbewegungen einstellen. Es eröffnet sich hier ferner eine Möglichkeit, anhand unserer Versuchsanordnung (Kinocilien des Froschrachendaches) ganz allgemein die Wirkung von Pharmaka zu testen. Die Untersuchungen werden am hiesigen Institut fortgeführt durch Dr. E. KLAPOETKE.

Zusammenfassung

1. Es besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung bei Schrankenzusammenbruch nach Cardiazolschock derart, daß (nach vorheriger i.v. Farbstoffgabe) bei Injektion von 20 mg/kg Cardiazol die Anfärbung des Gehirns signifikant geringer ist, als nach Injektion von 40 mg/kg Cardiazol. Mit Hilfe von halbtransparenten Folien wurde als Ausdruck des Grades der Blaufärbung ein „Blauwert“ ermittelt.
2. Die Cardiazol-Schwellendosis für den Zusammenbruch der Blut-Gehirnschranke liegt zwischen 10 und 17 mg/kg Cardiazol.
3. Befunde über die Schrankenwirkung von Ascorbinsäure und von Pernocton sowie Beobachtungen bei fraktionierter Gabe von Cardiazol und bei Cardiazolschock an chronisch infizierten Tieren werden mitgeteilt.

Literatur

BAUER, K. FR.: Organisation des Nervengewebes und Neurencytiumtheorie. München und Berlin: Urban & Schwarzenberg 1953. — BAUER, K. FR., u. H. LEONHARDT: Zur Kenntnis der Blut-Gehirnschranke. Cardiazolschock und Schrankenzusammenbruch. Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur. **193**, 68 (1955). — BAUER, K. FR., and H. LEONHARDT: A contribution to the pathological physiology of the Blood-Brain-Barrier. Megaphen stabilises the Blood-Brain-Barrier. J. Comp. Neur. (Im Druck). — BROMAN, T.: The permeability of the cerebrospinal vessels in normal and pathological conditions. Kopenhagen: Munksgaard 1949. — Cardiazol. Pharmakologie und Klinik, Ludwigshafen/Rh.: Knoll A.-G. 1951 („Cardiazol-Monographie“). — KAFKA, V.: Die Pathologie des Stoffaustausches zwischen dem Gehirn und dem übrigen Körper. Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur. **101**, 231 (1934). — LEONHARDT, H.: Intraplasmatischer Stofftransport und Blut-Gehirnschranke. Z. mikrosk.-anat. Forsch. **58**, 449 (1952). — WALTER, FR.: Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur. **101**, 195 (1934). — SPATZ, H.: Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur. **101**, 267 (1934).

Prof. Dr. K. FR. BAUER, Erlangen, Anatom. Institut der Universität