

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. J.-Ch. Tonn

**Magnesium, Tirilazad und Hypothermie –
Neuroprotektive Wirksamkeit einer Kombinationstherapie bei temporärer
und permanenter fokaler zerebraler Ischämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karsten Schöller

aus
Crailsheim

Jahr
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. R. Schmid-Elsaesser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. S. Nees
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. R. L. Haberl Prof. Dr. G. Hamann
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. S. Zausinger
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Thema der Arbeit	6
1.2 Globale vs. fokale zerebrale Ischämie	7
1.3 Epidemiologie des Schlaganfalls	8
1.4 Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie	10
1.4.1 Zerebrale Durchblutung und Penumbra	10
1.4.2 Energieverlust	12
1.4.3 Ca ²⁺ -Überladung	12
1.4.4 Exzitotoxizität	13
1.4.5 Freie Radikale	15
1.4.6 Azidose	17
1.4.7 Ischämisches Hirnödem	19
1.5 Neuroprotektion	21
1.5.1 Pathophysiologisch orientierte Neuroprotektion	21
1.5.2 Magnesium und Tirilazad	21
1.5.3 Hypothermie	24
1.5.4 Magnesium, Tirilazad und milde Hypothermie (MTH)	25
1.6 Fragestellung	28
 2 Methodik	 30
2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung	30
2.2 Laser-Doppler Flowmetrie	31
2.3 Intraluminales Fadenmodell der fokalen zerebralen Ischämie	33
2.4 Quantifizierung der ischämischen Schädigung	35
2.4.1 Quantifizierung des funktionellen neurologischen Defizits	35
2.4.2 Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens in den chronischen Versuchsgruppen	36
2.4.3 Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens in den akuten Versuchsgruppen	36
2.5 Experimentelle Gruppen I – temporäre Ischämie	38
2.5.1 MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie	38

2.6	Experimentelle Gruppen II – permanente Ischämie	40
2.6.1	Teil A: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – chronische Versuchsgruppen	40
2.6.2	Teil B: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – akute Versuchsgruppen	42
2.7.	Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Teil I: MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie	44
3.2	Teil IIA: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie - chronische Versuchsgruppen	50
3.3	Teil IIB: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie - akute Versuchsgruppen	53
4	Diskussion	57
4.1	Diskussion der Methodik	57
4.1.1	Das intraluminale Fadenmodell	57
4.1.2	Laser-Doppler Flowmerie	60
4.1.3	Neuro-Score	61
4.1.4	Infarktvolumina	62
4.2	Diskussion der Ergebnisse	63
4.2.1	Teil I: MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie	63
4.2.2	Teil IIA und IIB: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – chronische und akute Versuchsgruppen	66
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Danksagung	91
8	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Thema der Arbeit

Eine temporäre Okklusion einer hirnversorgenden Arterie ist bei zahlreichen neurochirurgischen Eingriffen erforderlich. Beispiele sind (1) Aneurysmaoperationen, (2) Gefäßtranspositionen, (3) extra-/intrakranielle Bypassoperationen und (4) Karotisendarterektomien.

Um das Gehirn bei längerer Unterbrechung der Durchblutung vor einem ischämiebedingten Schaden zu schützen, bedarf es protektiver Maßnahmen. Die Erforschung der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie brachte eine Reihe neuer Substanzen hervor, die im Experiment neuroprotektiv wirken.^{51,52} Um die Wirkung zu erhöhen, wurde vielfach eine Kombinationstherapie aus protektiven Substanzen gefordert. Im Rahmen eines umfassenden tierexperimentellen Projekts wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Kombinationstherapie, bestehend aus Magnesium, Tirilazad und milder Hypothermie (MTH) mit synergistischer protektiver Wirkung entwickelt^{71,72,128} und mit dem derzeitigen neurochirurgischen Standard in einem Modell der temporären fokalen zerebralen Ischämie verglichen.¹⁶² Es zeigte sich, dass die neu entwickelte Kombinationstherapie bei präischämischer Applikation den bisher verwendeten Verfahren sowohl hinsichtlich Verbesserung der neurologischen Erholung als auch hinsichtlich Reduktion des morphologischen Schadens deutlich überlegen ist.

Im Gegensatz zur bewusst induzierten temporären Okklusion einer Arterie im Rahmen einer Operation, bei der die Gabe hirnschützender Medikamente oder die Anwendung zerebroprotektiver Verfahren vor dem Verschluss möglich ist, kann die Therapie beim Schlaganfall naturgemäß erst nach dem Insult eingeleitet werden.

Die große epidemiologische Relevanz des Schlaganfalls und die bislang unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten waren Anlass für Teil I der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde die neuroprotektive Wirksamkeit der Kombinationstherapie (MTH) bei Gabe mit und nach einer temporären fokalen

Ischämie untersucht und das therapeutische Fenster, innerhalb dessen ein schützender Effekt erzielt werden kann, bestimmt.

In Teil IIA und IIB der Arbeit wurde die Wirksamkeit der Kombinationstherapie (MTH) bei permanenter fokaler Ischämie untersucht. Dies hat insofern klinische Relevanz, wenn nach einer Thrombembolie nicht zwangsläufig eine Rekanalisation eintritt oder wenn ein im Rahmen einer neurochirurgischen Operation verschlossenes Gefäß intraoperativ nicht mehr rekonstruiert werden kann.

1.2 Globale vs. fokale zerebrale Ischämie

Grundsätzlich sind zwei Formen der zerebralen Ischämie zu unterscheiden, die globale und die fokale Ischämie. Meist ist die globale zerebrale Ischämie Folge eines vorübergehenden Herzstillstandes, bei dem es zur kompletten Unterbrechung der Blutzufuhr zum Gehirn kommt, d.h. es gibt hierbei keine kollaterale Blutversorgung aus anderen Gefäßregionen. Nach 6 - 8 Sekunden findet sich in der grauen Substanz des Gehirns kein molekularer Sauerstoff mehr. EEG-Veränderungen treten auf. Nach etwa 10 Sekunden kommt es zur Bewusstlosigkeit und nach 3 - 4 Minuten ist die freie Glucose verbraucht. Nach 4 - 5 Minuten kann es zu ersten nekrotischen Prozessen in Nervenzellen kommen und eine globale zerebrale Ischämie von über 10 Minuten führt in der Regel zum Hirntod.^{37,110} In Abb. 1.1 sind im zeitlichen Ablauf Auswirkungen einer globalen Ischämie auf Gewebesauerstoff, das Bewusstsein, das EEG, die Morphologie und den Glucosegehalt der Nervenzellen dargestellt.

Hiervon abzugrenzen ist die fokale zerebrale Ischämie, der ischämische Schlaganfall. Hierbei führt eine gestörte Durchblutung im Territorium einer Hirnarterie zu fokalen Perfusionsdefiziten. Im Vergleich zur globalen Ischämie ist bei der fokalen Ischämie eine mehr oder weniger ausgeprägte kollaterale Blutversorgung vorhanden. Die Minderdurchblutung kann temporär sein, wie beispielsweise bei einer vorübergehenden Unterbrechung des arteriellen Blutstroms bei einer neurochirurgischen Operation, oder permanent, wie bei einem nicht rekanalisierten embolischen Schlaganfall.

1.3 Epidemiologie des Schlaganfalls

Die gesamtmedizinische Bedeutung des Schlaganfalls wird deutlich angesichts von 200000 Menschen, die pro Jahr in Deutschland einen Schlaganfall erleiden. 50 % der wegen akuter neurologischer Störungen hospitalisierten Patienten gehören der Gruppe der Schlaganfallpatienten an. Die Mortalität liegt bei etwa 25 % und immer noch ist der Schlaganfall an 3. Stelle der Todesursachenstatistiken der zivilisierten Länder. Die hohe Rate an schweren bleibenden Behinderungen (20 - 30 %) wie Aphasien oder Lähmungen führt nicht nur zu einer dramatischen Belastung der betroffenen Individuen und deren Familien, sondern auch der Volkswirtschaft: In den USA schätzt man die direkten und indirekten durch den Schlaganfall verursachten Kosten zwischen 30 und 40 Mrd. Dollar jährlich.³⁷

Die Folgen eines ischämischen Schlaganfalls sind je nach betroffener Hirnregion Halbseitenlähmungen, Sprachstörungen und der Ausfall höherer Hirnfunktionen.

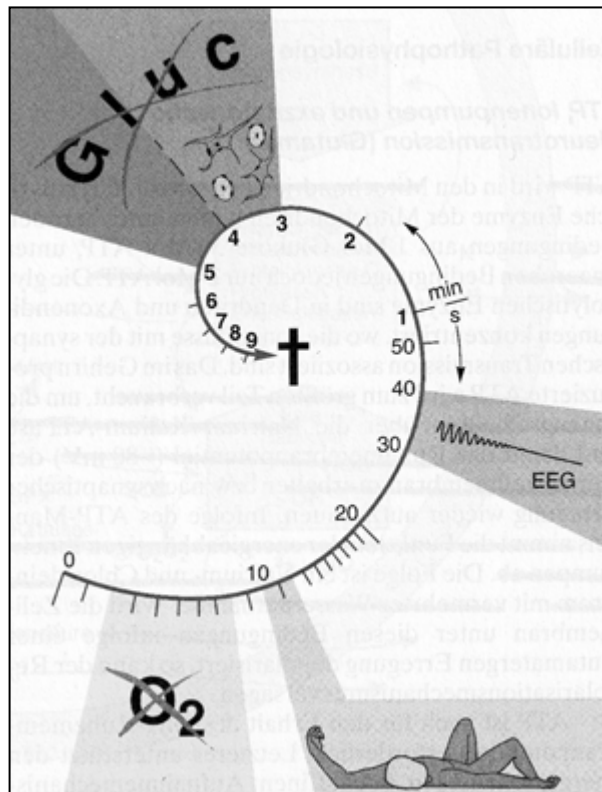


Abbildung 1.1: Auswirkungen einer globalen Ischämie

Schematische Darstellung der Auswirkungen einer globalen Ischämie auf Gewebesauerstoff, das Bewusstsein, das EEG, die Morphologie und den Glucosegehalt der Nervenzellen.

1.4 Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie

Die therapeutischen Möglichkeiten bei fokaler zerebraler Ischämie sind bis dato sehr begrenzt. Dies lässt sich teilweise auf ein unvollständiges Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen und des Zeitverlaufes der ischämischen Schädigung zurückführen. Durch die primäre Durchblutungsstörung werden vielfältige komplexe Prozesse ausgelöst, die selbständig ablaufen bzw. erst während einer Reperfusion aktiviert werden. Die folgenden Punkte sollen die wichtigsten Mechanismen erläutern.

1.4.1 Zerebrale Durchblutung und Penumbra

Das Gehirn macht mit seinen 1600 g etwa 2 % des Körpergewichtes aus, benötigt aber 20 % des Herz-Minuten-Volumens, um seinen Sauerstoff- und Energiebedarf zu decken. Durchschnittlich 55 ml/100g/min Blut durchströmen das gesunde menschliche Gehirn, wobei die graue Substanz des Kortex etwa 4 mal so stark durchblutet ist wie die weiße Substanz.¹¹⁰ Die normale Durchblutung wird über weite Blutdruckbereiche durch die Fähigkeit der zerebralen Widerstandsgefäße zur Autoregulation konstant gehalten. Sinkt die Hirndurchblutung und damit die Substrat- und Sauerstoffversorgung unter den Bedarf des Gehirns zur Aufrechterhaltung von Funktions- und Strukturstoffwechsel (die sogenannte Ischämie- bzw. Infarktschwelle) ab, so spricht man von einer zerebralen Ischämie. (Abb. 1.2)

Werden Flusswerte von 20 - 18 ml/100g/min unterschritten, so kommt es zunächst zu einem Funktionsverlust, erkennbar am isoelektrischen EEG.^{9,10,149,150} Morphologische Veränderungen oder gar ein Zelluntergang treten jedoch erst bei einem weiteren Absinken der Durchblutung unter Werte von 12 - 10 ml/100g/min auf. Bei Blutflusswerten zwischen 12 und 18 ml/100g/min bleibt der Strukturstoffwechsel erhalten. Man spricht vom Entstehen einer Penumbra.⁹ Im Bereich dieses ischämischen Halbschattens ist zwar die synaptische Übertragung eingestellt, das Ionengleichgewicht ist

jedoch, zumindest vorerst, noch erhalten. Der Ausfall der synaptischen Übertragung ist voll reversibel, falls rechtzeitig eine ausreichende Reperfusion wiederhergestellt werden kann.¹²⁰ So kann diese Zone auch noch Stunden nach einer Ischämie einer Therapie zugänglich sein. Man spricht von einem "therapeutischen Fenster", innerhalb dessen durch therapeutische Maßnahmen Hirnareale innerhalb der Penumbra gerettet werden können.^{60,121,139}

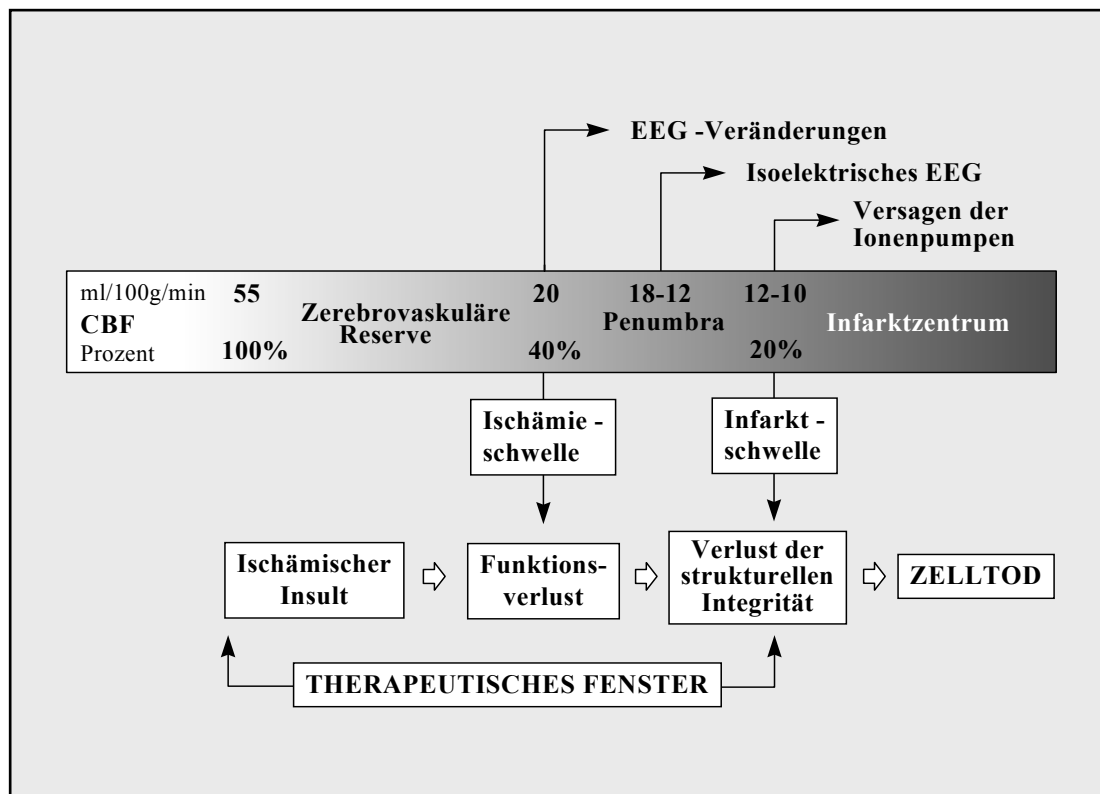


Abbildung 1.2: Zerebrale Mangelperfusion

Durchschnittlich 55 ml/100g/min Blut durchströmen das gesunde menschliche Gehirn. Der normale Blutfluss wird über weite Blutdruckbereiche konstant gehalten. Erst wenn Flusswerte von 20 - 18 ml/100g/min unterschritten werden, kommt es zu EEG-Veränderungen und schließlich zum Funktionsverlust, erkennbar am isoelektrischen EEG. Der Funktionsausfall ist jedoch nicht gleichbedeutend mit dem Auftreten morphologischer Veränderungen. Bei Blutflusswerten zwischen 12 und 18 ml/100g/min bleibt der Strukturstoffwechsel erhalten (Penumbra). Die Penumbra zeichnet sich dadurch aus, dass ein temporärer Funktionsverlust bei Wiederherstellung des Blutflusses voll oder partiell reversibel ist. Diese Zone kann auch Stunden nach der Ischämie einer Therapie zugänglich sein (therapeutisches Fenster). Bei anhaltenden Blutflusswerten unter 12 - 10 ml/100 g/min versagen die Ionenpumpen und die Zellen werden irreversibel geschädigt.

1.4.2 Energieverlust

Wird bei der zerebralen Ischämie die Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Substraten unterbrochen, so kommt die Produktion von Adenosin-Triphosphat (ATP) und anderen energiereichen Nucleosid-Triphosphaten zum Erliegen und die Reserven an ATP und Phosphokreatin werden aufgebraucht. Bereits zwei Minuten nach Eintritt der Ischämie sind kaum mehr Phosphokreatin und ATP im Gewebe nachweisbar.¹³⁶

Der Mangel an ATP, per se nicht ausschlaggebend für den Zelltod, stößt drei unterschiedliche Kaskaden an, die das Überleben der Zelle gefährden: Erstens kommt es über ein Versagen der Na^+/K^+ -ATPase zu einem Einstrom von Na^+ und Cl^- , osmotisch gefolgt von Wasser, sowie zu einer massiven Überladung der Zelle mit Ca^{2+} -Ionen. Diese Ca^{2+} -Überladung stellt einen besonders bedeutsamen Schritt in der Pathogenese des Hirninfarktes dar. Zweitens wird durch das Fehlen einer adäquaten Energiegrundlage die anaerobe Glycolyse stimuliert. Dies führt über eine Anhäufung des Endprodukts Laktat zur intra- und extrazellulären Azidose. Als dritte Konsequenz des Energieverlustes ist die strukturelle Integrität der Zelle bedroht, da die energiereichen Phosphate für die Synthese von Protein- und Lipidbausteinen zuständig sind, die die Zellstruktur tragen. Außerdem kommt es zum Abbau von Phospholipiden und zur Anhäufung der Abbauprodukte. Hierzu gehören Lysophospholipide, Diacylglyceride und freie Fettsäuren inklusive der Arachidonsäure.¹³⁶

1.4.3 Ca^{2+} -Überladung

Wie oben erwähnt ist die massive Überladung der Zelle mit Ca^{2+} -Ionen als Folge des Verlustes energiereicher Valenzen ein zentrales Ereignis bei der Entstehung des ischämischen Hirnschadens.^{26,140} Normalerweise pumpen energieabhängige ATPasen Ca^{2+} aktiv aus der Zelle oder in intrazelluläre Speicherorganellen wie z.B. das endoplasmatische Retikulum. So bleibt die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration etwa 1000fach niedriger als die extrazelluläre.¹¹⁰ Im energetischen Versagen während und nach einer

Ischämie kann jedoch die Konzentration um ein Vielfaches des physiologischen Wertes ansteigen. Ca^{2+} -Ionen gelangen durch spannungsabhängige Kanäle (VSCC), rezeptorgesteuerte Kanäle (v.a. NMDA-Rezeptoren) oder nicht-selektive Kationenkanäle (NSCC) in das Neuron. Erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} führt durch Enzymaktivierung zur Proteinphosphorylierung (Proteinkinase C),⁶⁹ Proteolyse (Proteasen),⁹⁷ Lipolyse (Phospholipase A2)⁴² und DNA-Fragmentierung (Endonukleasen).³⁹ Als Folge der Lipolyse wird "Platelet Activating Factor" (PAF)^{56,90} und Arachidonsäure freigesetzt.^{3,28} Die vermehrte Bildung und Metabolisierung von PAF und Arachidonsäure führt zur Entstehung freier Sauerstoffradikale.¹³⁸ Durch Stimulation der NO-Synthase wird die Bildung von NO katalysiert. NO kann selbst als Radikal vorliegen oder in Verbindung mit Superoxid-Anionen Peroxinitrit erzeugen.^{73,103} Eine weitere wesentliche Ursache für den exzessiven Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ist die Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum.

1.4.4 Exzitotoxizität

Die Exzitotoxin-Hypothese^{112-114,125,126} besagt, dass dem ischämiebedingten Untergang von Neuronen in erster Linie eine Akkumulation der exzitatorischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat zugrunde liegt. Glutamat gilt als der wichtigste erregende Transmitter im ZNS, ist andererseits aber auch potentiell toxisch, sofern in zu hoher Konzentration im Extrazellulärraum vorhanden. Diese Janus-köpfige Natur der Glutaminsäure hat zur Prägung des Begriffes "Exzitotoxin" geführt.⁸³

In direkter Folge des Energieverlustes kommt es neben den schon oben beschriebenen Mechanismen zur Wiederaufnahmestörung für Glutamat im Bereich der Präsynapsen und der Gliazellen.²⁷ Zudem führt eine Depolarisation des Neurons durch Funktionsstörung von ATP-abhängigen Ionenpumpen zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat. Die Aminosäure vermittelt ihre Wirkung im ZNS über vier derzeit bekannte Klassen von Glutamatrezeptoren.

Der NMDA-Rezeptor ist mit einem für Na^+ - und für Ca^{2+} -Ionen permeablen Ionenkanal assoziiert und somit der wichtigste Rezeptor für den Ca^{2+} -Einstrom.¹¹⁸ Bei nicht depolarisierter Zellmembran ist der Kanal durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert. Kommt es im ischämischen Gewebe jedoch zum Zusammenbruch des physiologischen Membranpotentials und der normalen Ionenhomöostase, so depolarisiert die Zellmembran. Bindet nun gleichzeitig ein Glutamatmolekül am Rezeptor, so öffnet sich der Ionenkanal und Ca^{2+} kann in die Zelle einströmen.

Eine zweite Klasse von Rezeptoren, die an der massiven Ca^{2+} -Überladung beteiligt sind, werden als metabotrope Glutamatrezeptoren bezeichnet. Sie setzen über eine Aktivierung der Phospholipase C Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum frei.²⁹

Kainat- und AMPA-Rezeptoren sind wie der NMDA-Rezeptor an Ionenkanäle gekoppelt, bewirken jedoch lediglich einen Einstrom von Na^+ -Ionen. Möglicherweise bedingt dieser Na^+ -Einstrom jedoch die für die Funktionsweise des NMDA-Rezeptors so wichtige Depolarisation der Zellmembran.

Zusammenfassend entsteht als Folge des Ablaufs der oben geschilderten molekularen Mechanismen ein Circulus vitiosus von sich gegenseitig bedingender Glutamatfreisetzung und Ca^{2+} -Überladung der Zelle. (Abb. 1.3)

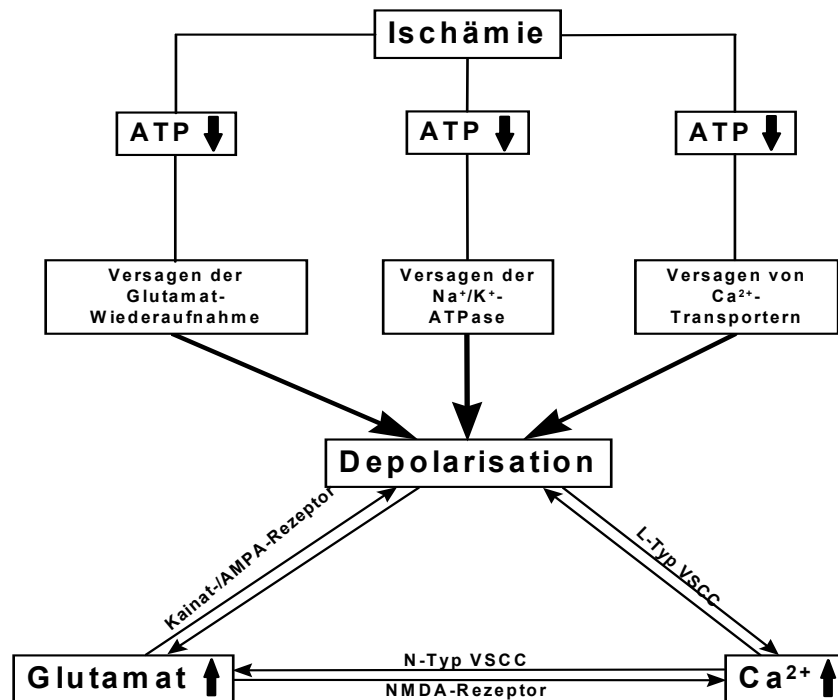


Abbildung 1.3: Circulus vitiosus

Als Folge des Substrat- und Sauerstoffmangels kommt es zu einem Verlust energiereicher Phosphate. Es versagen energieabhängige Transportvorgänge, was schließlich zur Depolarisation der Zelle führt. Zwischen Depolarisation, Glutamatfreisetzung und Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle bestehen Zusammenhänge, die über verschiedene Rezeptoren/Ionenkanäle vermittelt werden und so einen Circulus vitiosus aufrechterhalten.

1.4.5 Freie Radikale

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit ungepaarten, also „freien“ Elektronen, die die Tendenz haben, in Ihrer Elektronenhülle ein Elektronenpaar zu bilden. Hieraus resultiert Ihre besondere Reaktionsfreudigkeit. Sie reagieren mit fast allen organischen Molekülen, es werden DNA und Strukturproteine und insbesondere Phospholipide der Zellmembran und subzellulären Organellen angegriffen.^{25,66} Die höchste Affinität zeigen Radikale zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die im zentralen Nervensystem (ZNS) besonders häufig vorkommen. Zur sogenannten Lipidperoxidation kommt es, wenn ein Wasserstoffatom aus der Seitenkette einer ungesättigten Fettsäure durch den Angriff eines Radikals

entfernt wird. Dies führt zu einer Kettenreaktion mit der weiteren Zerstörung benachbarter Fettsäuren in den Zellmembranen.⁶⁵ Freie Radikale werden bei zerebraler Ischämie aus verschiedenen Quellen freigesetzt.

Hypoxanthin und Xanthin entstehen während der Ischämie. Ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel wird für eine Aktivierung von Proteasen verantwortlich gemacht, die Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase umwandeln. Xanthinoxidase wiederum katalysiert die Oxidation von Xanthin zu Harnsäure, sobald durch eine Reoxygenierung wieder Sauerstoff bereit steht. Produkte dieser Reaktion sind Superoxid und das Superoxid-Radikal $\bullet\text{O}_2^-$. Voraussetzung hierfür ist eine hohe O_2 -Spannung, wie sie beispielsweise bei Ischämie und nachfolgender Reperfusion vorkommt. Reagieren $\bullet\text{O}_2^-$ und Superoxid in der sogenannten Haber-Weiss-Reaktion miteinander, entsteht das extrem toxische und lipophile Hydroxyl-Radikal $\bullet\text{OH}$. Als Katalysefaktor dient Eisen, das entweder bei saurem pH-Wert (Azidose) aus Transferrin oder mit Hilfe von $\bullet\text{O}_2^-$ aus Ferritin freigesetzt wird.¹³⁷ Das von der Ca^{2+} -aktivierten NO-Synthetase (NOS) aus L-Arginin hergestellte $\text{NO}\bullet$ -Radikal wird vor allem für den am Gefäßendothel entstehenden Schaden verantwortlich gemacht. Es diffundiert in die glatte Gefäßmuskulatur und bewirkt eine Vasodilatation. Beckmann et al.¹⁴ zeigten, dass $\bullet\text{O}_2^-$ und $\text{NO}\bullet$ zum Peroxynitrat-Ion NO_3^- reagieren, das wiederum bei saurem pH zu NO_2 und $\bullet\text{OH}$ zerfällt.

Andere Quellen der Radikalbildung sind die Arachidonsäurekaskade, die Oxidation von Katecholaminen oder extravasiertem Hämoglobin sowie infiltrierende Leukozyten.^{83,84} Durch Akkumulation und Abbau von Arachidonsäure entstehen weitere biochemische Produkte wie Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine, welche eine Vasokonstriktion und somit eine Zirkulationsstörung verursachen können.

Die quantitative Bedeutung und der Zeitpunkt, an dem die jeweiligen für die Radikalbildung verantwortlichen Mechanismen wirken, ist letztlich nicht geklärt. Bei permanenter fokaler Ischämie kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Konzentration von Sauerstoffradikalen über die gesamte Ischämiedauer. Im Gegensatz dazu werden bei einer Reperfusion plötzlich massiv Sauerstoffradikale produziert.¹¹⁹ Offensichtlich werden die Voraussetzungen für die Radikalproduktion während der Ischämie

geschaffen, bei wiederhergestellter Sauerstoffversorgung nach Reperfusion können die Radikale dann massiv produziert werden. Der Gewebeschaden durch Radikale spielt folglich bei temporärer Ischämie eine weitaus größere Rolle als bei permanenter Ischämie.

1.4.6 Azidose

Ursächlich für den Abfall des intra- und extrazellulären pH-Wertes während der Ischämie ist ein Missverhältnis zwischen Glycolyse und oxidativer Phosphorylierung. Unter aeroben Bedingungen wird Glucose in der Glycolyse zu 2 M Pyruvat abgebaut, hierbei entstehen 2 M ATP. Bei Anwesenheit von O_2 wird Pyruvat dann von der Pyruvatdehydrogenase und sukzessive von verschiedenen mitochondrialen Reaktionen zu CO_2 und H_2O verstoffwechselt. Der Energiegewinn beträgt hierbei etwa 36 M ATP. Kommt es nun zu einem O_2 -Mangel wie bei Hypoxie oder Ischämie, so bleibt die Reaktionskaskade beim Schritt der Pyruvatoxidation stehen und Pyruvat wird von der Pyruvatreduktase zu Laktat umgesetzt. Da die während der Glycolyse entstehenden 2 M ATP zu 2 M ADP und intrazellulärem Phosphat hydrolysiert werden, beträgt das Nettoresultat des anaeroben Abbaus von 1 M Glucose: 2 M Laktat + 2 M H^+ . Aus der anaeroben Glucoseumsetzung folgt: Es entstehen weniger Energieträger in Form von ATP und das Zellmilieu wird sauer. Außerdem besteht ein komplexer Zusammenhang zwischen ATP-Produktion und dem Ca^{2+} -Haushalt der Zelle. Da die Sequestration von Ca^{2+} in die Mitochondrien energieabhängig ist und bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (wie bei Ischämie s.o.) energiereiche Phosphate für den Betrieb der Transporter abgezogen werden, entsteht von vornherein schon weniger ATP. Diese energiereichen Valenzen fehlen dann wiederum bei energieabhängigen Vorgängen wie z.B. dem Betrieb der Ca^{2+} -sequestrierenden Transporter mit der Folge eines rasanten Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Anaerob entstehendes H^+ vertreibt hierbei Ca^{2+} aus seinen Bindungen und trägt dadurch ebenfalls zur massiven Ca^{2+} -Überladung der Zelle bei.¹³⁶

Faktoren, die das Ausmaß der intra- und extrazellulären Azidose bedingen, sind zum einen die Plasmaglukosekonzentration vor Ischämie sowie der

Glycogengehalt des Gewebes und zum anderen der Verlust an energiereichen Valenzen in Form von ATP. Während der Ischämie ist die Durchblutung und somit die Substratversorgung vermindert, Glucose ist hierbei der limitierende Faktor für die Laktatproduktion. So kann ein erhöhter Glucoseverbrauch wie bei Hyperglycämie die Azidose verstärken. Ist allerdings die ATP-Konzentration nur marginal vermindert, so wird auch eine Hyperglycämie keine verstärkte Akkumulation von Laktat und H^+ bewirken. Anders bei sehr niedrigem ATP, wo die größte Menge an Glucose anaerob verstoffwechselt wird.¹³⁶ Nakai et al.¹⁰⁸ diskutierten eine Abhängigkeit des intrazellulären Azidosegrades von der Durchblutung. Ihre Daten zeigten, dass nur ein Abfall der Hirndurchblutung unter 20 ml/100g/min zu einer ausgeprägten Azidose führte, Verhältnisse, wie sie bei einer fokalen Ischämie nur im gering durchbluteten Zentrum (Core) der Läsion vorherrschen. Hier kann es zu pH-Werten zwischen 6,2 und 6,4 kommen, wie sie normalerweise nur bei globaler Ischämie beobachtet werden.³⁰ Daher ist es bei tierexperimentellen Ischämie Studien wichtig, die Glucosekonzentration der Tiere auf einem gleichmäßig niedrigen Niveau und den pH-Wert während des gesamten Experiments konstant zu halten.

1.4.7 Ischämisches Hirnödem

Das ischämische Hirnödem zählt zu den sogenannten sekundären Hirnschäden, jenen Schäden also, die sich erst mit einer gewissen Latenz nach Eintritt des Infarktes entwickeln.¹⁴¹ Kurz nach Induktion der Ischämie kommt es wie oben beschrieben zu einem Verlust energiereicher Phosphate. Energieabhängige Prozesse wie der Na^+ -Transport aus der Zelle, vermittelt durch die Na^+ - K^+ -ATPase, kommen zum Erliegen. Na^+ und Cl^- , osmotisch gefolgt von H_2O , strömen in die Zelle ein.^{11,12} Neurone und Gliazellen schwellen gleichermaßen an, man spricht von einem zytotoxischen Hirnödem. Dieser ersten Phase in der zeitlichen Entwicklung des ischämischen Hirnödems folgt die für die Hirnschwellung quantitativ bedeutungsvollere 2. Komponente, das sogenannte vasogene Hirnödem.¹³³ Dieses basiert auf dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke entweder durch eine direkte Zerstörung von Endothelzellen, z.B. durch freie Radikale, oder durch die Zerstörung von tight junctions zwischen den Endothelzellen. In der Folge kommt es zu einem Durchtritt von proteinreicher Flüssigkeit, der etwa 4 - 6 Stunden nach Gefäßokklusion beginnt. Je nach Art und Schwere des Insults wird das Maximum nach 2 - 4 Tagen erreicht.¹³³ Nach etwa einer Woche normalisiert sich der Wassergehalt des Gewebes wieder.

Die Bedeutung des ischämischen Hirnödems liegt einerseits in der Massenverschiebung, in bildgebenden Untersuchungen als Mittellinienshift zu erkennen. In extremer Ausprägung führt eine transtentorielle Einklemmung zum Tod. Andererseits bewirkt eine ödembedingte Erhöhung des intrakraniellen Drucks eine Abnahme des zerebralen Perfusionsdrucks, also eine sekundäre Ischämie.

Eine zusammenfassende Darstellung der in diesem Kapitel besprochenen pathophysiologischen Mechanismen bei zerebraler Ischämie findet sich in Abbildung 1.5.

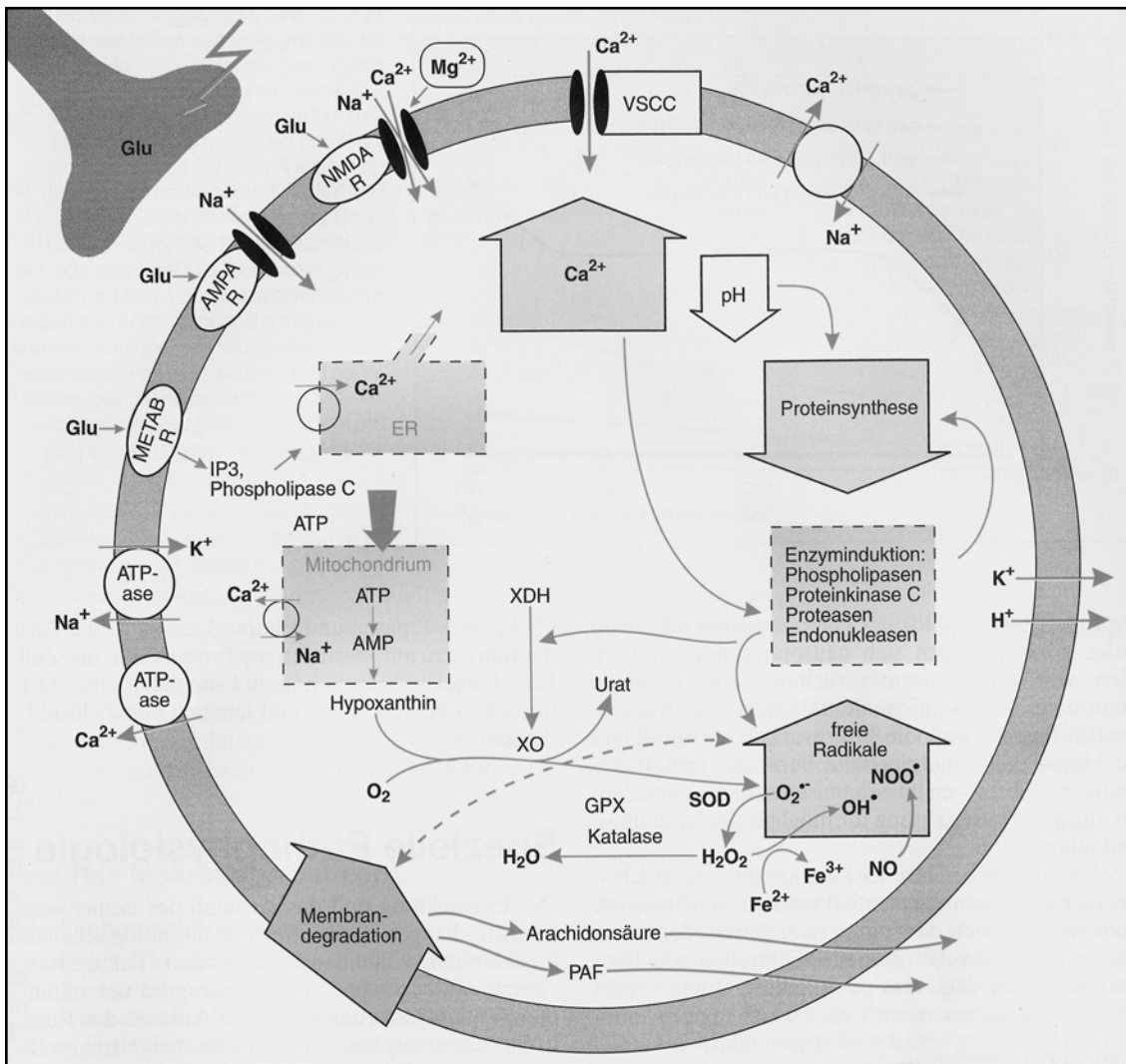


Abbildung 1.5: Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Zusammenfassende Darstellung der pathophysiologischen Abläufe im Rahmen der zerebralen Ischämie.

1.5 Neuroprotektion

Während verschiedener neurochirurgischer Eingriffe kann es notwendig werden, temporär ein hirnversorgendes Gefäß zu verschließen. Abhängig von der Dauer und Schwere der dadurch erzeugten Ischämie würde dies ohne geeignete Schutzmaßnahmen die Gefahr des Untergangs von Hirngewebe beinhalten. Bei länger dauerndem Gefäßverschluss (je nach Gefäßabschnitt 5-20 Minuten) werden deshalb zum perioperativen Gewebeschutz Neuroprotektiva eingesetzt. Am weitesten verbreitet sind Barbiturate, die als "Goldstandard" bei neurovaskulären Operationen angesehen werden,⁶⁸ außerdem werden Kortikosteroide, Mannitol und Kalziumantagonisten wie Nimodipin gegeben. Bis dato existiert jedoch kein in prospektiven Studien geprüfter Standard zur Neuroprotektion.

1.5.1 Pathophysiologisch orientierte Neuroprotektion

Die vorausgehenden Kapitel zur Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie verdeutlichen, wie komplex die Mechanismen und Zusammenhänge sind, die sich auf molekularer Ebene abspielen. Trotzdem lassen sich einige Schlüsselmechanismen identifizieren, deren potentielle Antagonisierung für eine Neuroprotektion besonders vielversprechend ist. Die größte experimentelle Erfahrung besteht mit Kalziumantagonisten, Glutamatantagonisten sowie Radikalfängern und Hemmstoffen der Lipidperoxidation.

1.5.2 Magnesium und Tirilazad

Viele Medikamente, die im Tierexperiment erfolgreich die pathophysiologische Kaskade antagonisieren, sind allerdings mit ausgeprägten Nebenwirkungen behaftet, so dass eine Verwendung der Substanzen am Patienten nicht in Frage kommt. Sucht man nun Pharmaka, die pathophysiologisch orientiert wirken und außerdem noch für den Einsatz am Menschen zugelassen sind,

so verbleiben nur wenige Substanzen wie etwa Magnesium und das 21-Aminosteroid Tirilazad (Freedox®).

Magnesium ist ein physiologischer Kalziumantagonist und reguliert sowohl Gefäßtonus als auch Zellmembranfunktionen. Außerdem ist das Kation an der Aktivierung von etwa 300 Enzymen beteiligt, wovon einige energieproduzierende und energiekonsumierende Reaktionen katalysieren.⁴⁰ Magnesiumionen blockieren spannungsabhängig den NMDA-Rezeptor-Ionenkanal und verhalten sich pharmakologisch wie nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten. An der Zellmembran wird der Kalziumeinstrom sowohl über spannungsabhängige als auch über rezeptorgesteuerte Kationenkanäle gehemmt, in Mitochondrien wird die Kalziumaufnahme vermindert.¹⁵⁴ Eine neuroprotektive Wirkung wurde in Modellen der fokalen und globalen Ischämie bei verschiedenen Tierspezies nachgewiesen.^{49,76,96,111,131} In einer Mikrodialyse-Studie bei Ratten wurde gezeigt, dass Magnesium die ischämieinduzierte Akkumulation von Glutamat und Aspartat im Extrazellulärraum vermindert.⁵⁰ Magnesium ist leicht verfügbar und dabei sehr günstig. Hinzu kommt ein bewährtes Sicherheitsprofil, da das Ion schon seit längerem als Standardmedikation bei der Eklampsie eingesetzt wird. In einer klinischen Studie an Schlaganfallpatienten zeigte sich ein besseres klinisches Outcome in der innerhalb von 12 Stunden nach dem Apoplex mit MgSO₄ behandelten Gruppe (30% verstorben oder behindert gegenüber 40% in der Placebogruppe). Eine prospektive Multizenter-Studie (IMAGES, Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke Trial) wird derzeit durchgeführt.¹⁰⁶

Das 21-Aminosteroid („Lazaroid“) *Tirilazad* (Freedox®) ist ein potenter Inhibitor der durch Sauerstoff-Radikale induzierten und durch Eisen katalysierten Lipidperoxidation in mikrovaskulärem Gewebe und Nervengewebe. Diese Wirkungen sind bei Tirilazad im Vergleich zu dem Glucocorticoid Methylprednisolon, von dem die Substanz abgeleitet ist, noch stärker ausgeprägt. Hall et al.⁶⁴ konnten zudem in vitro zeigen, dass die antioxidative Potenz von Tirilazad etwa 100 mal stärker als die von Vitamin E ist. Das Aminosteroid hilft aber auch, die Konzentration dieses wichtigsten endogenen Antioxidans beizubehalten, verringert die durch Lipidperoxidation

induzierte Freisetzung von Arachidonsäure, stabilisiert Zellmembranen und durch seine Affinität zum zerebrovaskulären Endothel speziell auch die Blut-Hirn-Schranke und wirkt als Fänger von Hydroxyl-Radikalen. Die zerebroprotektive Wirksamkeit von Tirilazad wurde bei verschiedenen Tierspezies und in verschiedenen Modellen der ZNS-Schädigung (Ischämie, Subarachnoidalblutung, Vasospasmus, Trauma) überzeugend nachgewiesen.^{63,64}

In einem Rattenmodell der temporären fokalen zerebralen Ischämie konnten Xue et al.¹⁵⁸ bei Verabreichung von Tirilazad vor experimenteller MCA-Okklusion eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens nachweisen. Die Ergebnisse bei permanenter fokaler Ischämie sind widersprüchlich. Während Xue et al.¹⁵⁸ keine Verringerung der Infarktgröße sahen, demonstrierten Park et al.¹¹⁶ sowohl ein geringeres neurologisches Defizit als auch eine geringere Infarktgröße bei den mit dem Aminosteroid behandelten Tieren.

In einer klinischen Studie an Schlaganfallpatienten, die Tirilazad im Durchschnitt 4,3 Stunden nach dem Insult erhielten, konnte keine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen werden, wobei eine Möglichkeit für das Ausbleiben eines signifikanten Effektes der späte Applikationszeitpunkt¹ außerhalb eines nach experimentellen Daten diskutierten therapeutischen Fensters von ca. 3 Stunden¹⁹ sein könnte.

Internationale Multizenter-Studien ergaben eine signifikante Abnahme der Mortalität und bessere Erholung bei Patienten mit schwerer aneurysmatischer Subarachnoidalblutung.⁸¹ Tirilazad wurde zur Prophylaxe und Behandlung einer ischämischen Schädigung bei Patienten mit Subarachnoidalblutung in einigen Ländern zugelassen.

1.5.3 Hypothermie

Nachdem die Hypothermie therapeutisch zunächst bei völlig unterschiedlichen Indikationen eingesetzt worden war,^{43,143} wurde sie als protektive Maßnahme in der Neurochirurgie mit Ausnahme der Anwendung bei Operationen komplexer Aneurysmen des hinteren Kreislaufs, die nur unter Herzstillstand und tiefer Hypothermie angegangen werden können,^{88,144,146} aufgrund vermehrter Komplikationen wie Erhöhung der Blutviskosität, erhöhter Pneumonie- und Sepsisrate, Pankreatitiden, kardialen Arrhythmien und negativer Inotropie bald wieder aufgegeben.^{132,155} Allerdings scheinen diese potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen bei milder Hypothermie nicht oder nur in geringem Ausmaß aufzutreten.¹³²

Als milde Hypothermie wird hierbei ein Temperaturbereich von 35 - 33 °C bezeichnet, von moderater Hypothermie spricht man in einem Bereich von 32 - 29 °C, von tiefer Hypothermie von 28 - 17 °C und von profunder Hypothermie von 16 - 4°C.^{132,155}

Nachdem in Tierexperimenten gezeigt werden konnte, dass das Absenken der Körper- bzw. Hirntemperatur um nur 1-2 °C vor den Folgen der globalen Ischämie schützen kann,¹³² wurden zahlreiche neue Untersuchungen mit milder Hypothermie durchgeführt.^{35,54,86}

Für den neuroprotektiven Effekt der Hypothermie werden hierbei unterschiedliche Mechanismen wie eine Prävention postischämischer Perfusionsstörungen,⁸⁰ eine Verminderung der ischämieinduzierten Glutamatfreisetzung,^{24,55,74} eine Unterdrückung der Aktivität freier Radikale⁷⁸ sowie eine bessere Erholung des Energiestoffwechsels und des lokalen Glucosemetabolismus verantwortlich gemacht.^{22,99}

Tierexperimentelle Daten zu milder bis moderater Hypothermie, die an Rattenmodellen der fokalen zerebralen Ischämie erhoben wurden, zeigen Reduktionen des Infarktolumens von bis zu 80 %, wobei der Effekt bei temporärer Ischämie stärker als bei permanenter ausgeprägt zu sein scheint.^{77,104} Außerdem spielt neben dem Grad und dem Zeitpunkt der Induktion einer Abkühlung auch die Dauer der Hypothermie eine wichtige Rolle.¹⁵⁷

Mehrere klinische Studien mit therapeutischer Hypothermie bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma sind mittlerweile abgeschlossen.^{32,134,135} Vor kurzem wurden die Ergebnisse einer Multizenterstudie² veröffentlicht, bei der Patienten mit globaler zerebraler Ischämie nach Kreislaufstillstand mit milder Hypothermie behandelt worden waren (105 Minuten Median zwischen Wiedereinsetzen des Kreislaufs und Induktion der Hypothermie). Hierbei zeigte sich eine Verbesserung des neurologischen Outcomes und eine verminderte Mortalität .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hypothermie als wirkungsvollster Schutz bei experimenteller Ischämie gilt.¹³ Für die Entwicklung einer optimalen Behandlungsstrategie ist daher zu fordern, dass potentiell zerebroprotektive Medikamente einzeln oder in Kombination entweder der Hypothermie überlegen sind oder mit ihr synergistisch wirken.

1.5.4 Magnesium, Tirilazad und milde Hypothermie (MTH)

Prozesse auf molekularer Ebene, die an der Entstehung des ischämischen Hirnschadens beteiligt sind, können als Ziele einer pharmakologischen Intervention betrachtet werden. Hierzu gehören die Akkumulation von exzitotoxischem Glutamat, die Überladung der Zelle mit Kalzium, die Bildung freier Radikale und die Lipidperoxidation. Obwohl viele therapeutische Ansätze im Tierversuch vielversprechend aussahen, waren die Ergebnisse der meisten klinischen Studien ernüchternd. Aus diesem Grund wurde von vielen Autoren die Überprüfung von kombinierten therapeutischen Ansätzen befürwortet.^{4-6,8,18,34,148} Eine simultane Antagonisierung mehrerer Mechanismen der komplexen ischämischen Kaskade könnte zu synergistischen Effekten führen.^{6,17,44,45,101,147} An einem Rattenmodell der temporären fokalen zerebralen Ischämie wurden von unserer Arbeitsgruppe Versuche zur Evaluation unterschiedlicher Kombinationen von Kalzium-, Glutamatantagonisten und Antioxidantien durchgeführt. Die Kombination des Kalzium- und Glutamatantagonisten Magnesium mit dem Antioxidans Tirilazad erwies sich als synergistisch und reduzierte das Volumen des Hirninfarktes um 59 % im Vergleich zu den Kontrolltieren. Magnesium und

Tirilazad als Monotherapie reduzierten den Hirninfarkt jeweils um 25 % und 48 %.¹³⁰ In Kombination mit milder Hypothermie von 33 °C ließ sich die Wirksamkeit der Pharmaka noch steigern. Reduzierte in dieser Versuchsreihe die Kombination von Magnesium und Tirilazad den Hirninfarkt um 56 % und milde Hypothermie allein um 63 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, so hatten die mit der Kombination MTH behandelten Tiere einen um 77 % im Vergleich zu den Kontrollgruppe kleineren Hirninfarkt bei Gabe des Cocktails vor Induktion der Ischämie.¹²⁸ In einer nächsten Versuchsreihe verglichen wir die Wirksamkeit des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Cocktails MTH mit der neurochirurgischen Standardtherapie (bestehend aus: Nimodipin, Mannitol und Dexamethason) in Kombination mit einem durch Methohexital induzierten Barbituratcoma. MTH reduzierte das Hirninfarktvolumen um 73 % im Vergleich zur Kontrollgruppe und war damit der bisherigen neurochirurgischen Standardmedikation in Kombination mit Barbituratcoma mit einer Reduktion des Hirninfarktes um 36 % gegenüber den Kontrolltieren deutlich überlegen.¹⁶²

Publikation	Versuchsreihe	Reduktion des Infarktvolumen	Neurologisch unauffällig
Schmid-Elsaesser et al. 1999 ¹³⁰	Ktr. vs. M	- 25 %	6/10
	Ktr. vs. T	- 48%	6/10
	Ktr. vs. M+T	- 59 %	9/10
Schmid-Elsaesser et al. 1999 ¹²⁸	Ktr. vs. M+T	- 56 %	6/10
	Ktr. vs. H	- 63 %	8/10
	Ktr. vs. M + T + H	- 77 %	10/10
Zausinger et al. 2001 ¹⁶²	Ktr. vs. St.+ Barb.	- 36 %	4/10
	Ktr. vs. M + T + H	- 73 %	10/10

Tabelle 1.1: Bisherige Versuchsreihen

Zusammenfassung bisheriger Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe. Dargestellt sind Publikation, Versuchsreihe (Ktr. = kontrollgruppe, M = Magnesium, T = Tirilazad, H = Hypothermie, St. = Standardmedikation Nimodipin, Mannitol und Dexamethason, Barb. = Barbituratcoma), Reduktion des Gesamtfarktvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie die Anzahl der neurologisch unauffälligen Tiere in der jeweiligen Therapiegruppe am Ende des 7-tägigen Beobachtungszeitraums.

Die überzeugenden experimentellen Ergebnisse, die geringen Nebenwirkungen und die klinische Zulassung machen MTH zu einem idealen Kandidaten für eine klinische Überprüfung in der Neurochirurgie. Als klinisches Modell scheint die temporäre Gefäßokklusion im Rahmen der Aneurysmaausschaltung am besten geeignet zu sein. Ein diesbezüglicher Antrag wurde von der Ethikkommission der LMU München genehmigt und eine prospektive, randomisierte klinische Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von MTH in der Aneurysmachirurgie wurde im Jahr 2000 begonnen.

1.6 Fragestellung

Im Rahmen der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien konnte die neuroprotektive Wirksamkeit von MTH bei der temporären fokalen zerebralen Ischämie deutlich nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund einer bewusst induzierten, temporären Okklusion einer hirnversorgenden Arterie, wie dies beispielsweise bei einer Aneurysmaoperation häufig erforderlich ist, wurde die Therapie im Experiment bereits vor Induktion der zerebralen Ischämie begonnen.

Bei einem ischämischen Schlaganfall sind Umfang und Wirksamkeit der sich derzeit im klinischen Einsatz befindlichen therapeutischen Maßnahmen deutlich begrenzt. So erscheint es lohnenswert, die Möglichkeiten des kombinierten Therapieansatzes auch vor diesem Hintergrund zu untersuchen. Dies führte uns zu folgenden Fragestellungen:

1. Wie ausgeprägt ist die Wirksamkeit von MTH vor dem klinischen Hintergrund eines ischämischen Schlaganfalls mit späterer Reperfusion. D.h. bei Therapiebeginn nach Induktion einer temporären fokalen zerebralen Ischämie? Wie lange ist das therapeutische Zeitfenster, innerhalb dessen noch eine neuroprotektive Wirksamkeit der Therapie zu erwarten ist, offen?

In den bisherigen Versuchsreihen wurde das neu entwickelte multimodale Therapiekonzept auf seine Wirkung bei temporärer zerebraler Ischämie hin untersucht. Hiermit sollte die klinische Situation einer temporären Unterbrechung der zerebralen Durchblutung bei neurochirurgischen Operationen oder im ersten Teil dieser Studie auch bei einem spontan oder aufgrund therapeutischer Intervention rekanalisierten Gefäß im Sinne eines ischämischen Schlaganfalls im Experiment abgebildet werden.

Sowohl im neurologischen als auch im neurochirurgischen Fachgebiet kann jedoch auch die Situation eines anhaltenden Verschlusses einer hirnversorgenden Arterie auftreten. Dies betrifft beispielsweise Schlaganfall-Patienten, bei denen nach einer Thrombembolie keine spontane

Rekanalisation eintritt, die die Kriterien für eine Lysetherapie nicht erfüllen oder bei denen diese Therapie nicht zu dem erhofften Erfolg führt. Ein anderes Beispiel sind Patienten, bei denen es intraoperativ zu einer nicht-rekonstruierbaren Läsion einer hirnversorgenden Arterie kommt. So stellt sich für den zweiten Teil der aktuellen Studie die Frage:

2. Wie wirksam ist das neu entwickelte multimodale Therapiekonzept (MTH) im Rahmen einer permanenten fokalen zerebralen Ischämie?

2 Methodik

2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Bei allen Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 250 – 300 g verwendet (Charles River Laboratory, Deutschland). Ab 12 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten die Tiere kein Futter mehr, hatten aber freien Zugang zu Wasser. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Behälter mit 4 Vol % Halothan. Die Tiere wurden mit 0,5 mg/kg Atropin s.c. prämediziert und orotracheal intubiert. Die Narkose wurde mit 0,8 % Halothan in 70 % Lachgas (N₂O) und 30 % Sauerstoff (O₂) unter druckkontrollierter Beatmung aufrechterhalten (Pressure Controlled Respirator, RSP 1102, Kent Scientific Corporation, USA).¹⁶⁰ Die rektal gemessene Körpertemperatur wurde mit Hilfe einer Wärmeplatte bei 37,0°C gehalten. Die Hirntemperatur korreliert mit der Temperatur unter dem M. temporalis.^{23,100} Daher wurde ein in eine Kanüle eingelötetes Miniaturmantelthermoelement (AB Ac 025/TI/335/D 40/2 AB K/2 m, THERMOCOAX, Philips Industrial Electronics GmbH, Deutschland) unter dem M. temporalis plaziert. Über unabhängige Regelkreise (Industrial Controller Version 407, Philips Prozess- und Maschinen-Automation GmbH, Deutschland) wurden die subtemporale und die rektale Temperatur konstant bei 37,0 °C gehalten. In den mit Hypothermie behandelten Versuchsgruppen wurden die an beiden Stellen gemessenen Temperaturen durch Auflage von Kühlelementen auf 33,0 °C gesenkt und dann konstant gehalten. Zur Blutdruckkontrolle, Bestimmung von Laborparametern und arteriellen Blutgasen zur Narkosesteuerung wurde ein Katheter in die Schwanzarterie und zur intravenösen Infusion ein Katheter in die V. femoralis gelegt (Polyethylen, Portex, England). Während des Versuchs wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), Blutgase und Blutzuckerspiegel kontrolliert und aufgezeichnet.

2.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Über dem somatosensorischen Kortex wurde beidseits 5 mm lateral und 1 mm dorsal des Bregmas ein Bohrloch angelegt (Durchmesser: 1 mm), ohne die Dura mater zu verletzen. Dieses Areal repräsentiert das Versorgungsgebiet der A. cerebri media.⁹³ Die Versuchstiere wurden dann in ihrer endgültigen Position im Stereotax unter Schonung der Trommelfelle fixiert (Model 900, David Kopf Instruments, USA). Die Spitzen zweier abgewinkelter Laser-Doppler Sonden (Spezialanfertigung, Medizintechnik Lawrenz, Deutschland) wurden mittels Mikromanipulatoren in den Bohrlöchern platziert. (Abb. 2.1)

Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine kontinuierliche Messung (2 Hz) des lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF, local cerebral blood flow) bzw. der mikrovaskulären Perfusion in beiden Hemisphären (MBF3D, Moor Instruments Ltd., England). Durch den Abfall des LCBF wird die Induktion der Ischämie objektiviert. Relative Veränderungen der lokalen Durchblutung, beispielsweise im Sinne einer postischämischen Hyper- oder Hypoperfusion, oder eine Beeinflussung durch Pharmaka werden erkennbar.^{36,58} Kommt es aufgrund intrakranieller Gefäßperforation zu einer Subarachnoidalblutung (SAB), kann dies dank des LCBF-Monitorings sofort erkannt und die Versuchstiere aus der Studie ausgeschlossen werden. Eine insuffiziente Gefäßokklusion, die als häufigste Komplikation dieses Modells beschrieben ist, kann binnen Sekunden erfasst und korrigiert werden.¹²⁹

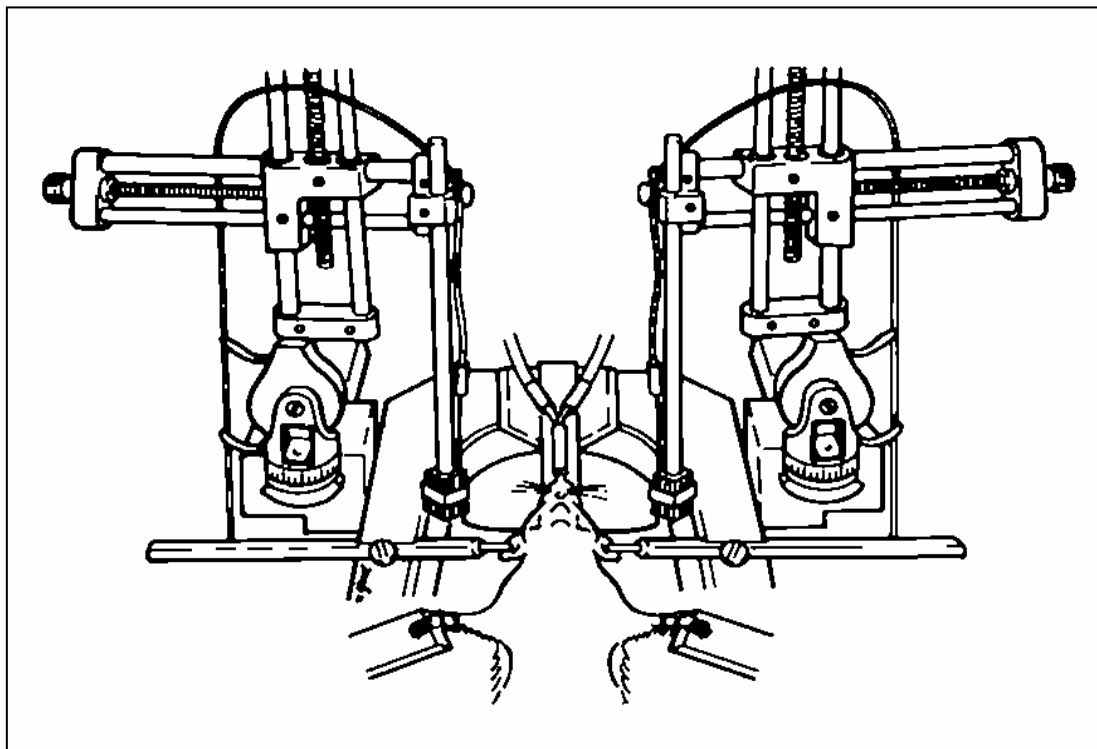


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau

Die Versuchstiere werden in Rückenlage im Stereotax fixiert. Die Spitzen zweier abgewinkelter Laser-Doppler Sonden werden mit Hilfe von Mikromanipulatoren in den vorher angelegten Bohrlöchern plaziert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine kontinuierliche Messung der lokalen mikrovaskulären Perfusion in beiden Hemisphären ohne Repositionierung der Sonden.

2.3 Intraluminales Fadenmodell der fokalen zerebralen Ischämie

Als Modell sowohl für die Versuche zur temporären als auch zur permanenten fokalen Ischämie wurde das intraluminale Fadenmodell nach Koizumi et al.⁸⁵ (Okklusion der A. cerebri media bei Ratten mit und ohne Induktion einer Rezirkulation) ausgewählt. Hierbei wird im Halsbereich ein paramedianer Hautschnitt angelegt und das Platysma durchtrennt. Über eine Verlagerung der oberflächlich gelegenen Gdl. submandibularis zusammen mit dem M. sternocleidomastoideus nach lateral und durch gleichzeitiges Abschieben der Zungenbeinmuskulatur nach medial ergibt sich der Zugang zur A. carotis. Die A. carotis communis und die Karotisbifurkation werden mikrochirurgisch vom umgebenden Bindegewebe unter Schonung des N. vagus freipräpariert. Anschließend wird die A. carotis externa aufgesucht, etwa 5 mm distal der Karotisbifurkation ligiert und durchtrennt.

Ein 4-0 Prolene-Faden (Ethicon GmbH, Deutschland) wird über den proximalen Stumpf der A. carotis externa in die A. carotis interna vorgeschoben bis es zu einem Abfall der Perfusion im ipsilateralen Mediaversorgungsgebiet kommt, der sich durch eine Reduktion des Laser-Doppler Signals auf 20 - 30 % des Ausgangswertes darstellen lässt. Die distalen 5 mm des Fadens sind mit einem Silikonzylinder (Durchmesser 0.28 mm) beschichtet (Rhodorsil RTV 1556 A and B Pink, Rhône-Poulenc, Frankreich). Nach dieser Vorgehensweise liegt der Zylinder im Circulus Willisii und verschließt den Abgang der A. cerebri media. (Abb. 2.2)

Bei den Versuchen mit temporärer Ischämie wird eine Rezirkulation im Mediaversorgungsgebiet durch Zurückziehen des Fadens in den Stumpf der A. carotis externa nach 90 Minuten erreicht. Bei den Untersuchungen mit permanenter Ischämie wird bei den Tieren der chronischen Versuchsgruppe (Teil IIA) nach 90 Minuten das proximale Ende des Okkluderfadens am Stumpf befestigt und der überstehende Rest abgesetzt.

Der Verlauf des LCBF wird je nach Versuchsgruppe mindestens für weitere 60 Minuten verfolgt und aufgezeichnet.

Abschließend werden bei den Tieren in den chronischen Versuchsgruppen alle Katheter und Sonden entfernt, die Haut verschlossen und die Tiere extubiert, sobald eine ausreichende Spontanatmung sichergestellt ist.

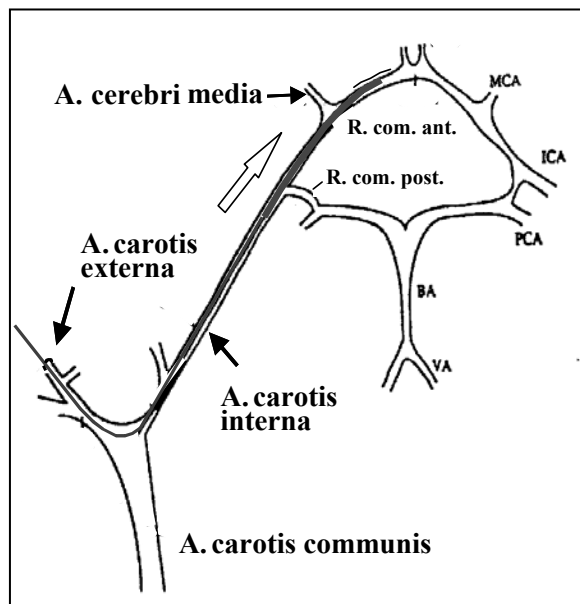


Abbildung 2.2: Okklusion der A. cerebri media.

Ein 4-0 Prolene-Faden wird über die A. carotis externa in die A. carotis interna eingeführt und vorgeschoben, bis sein distales, silikonbeschichtetes Ende den Abgang der A. cerebri media verschließt. Die Kollateralzirkulation über die A. communicans anterior und posterior ist ebenfalls ausgeschaltet.

BA = A. Basilaris; ICA = A. carotis interna; MCA = A. cerebri media; PCA = A. cerebri posterior; VA = A. vertebralis.

2.4 Quantifizierung der ischämischen Schädigung

Zur Quantifizierung der ischämischen Schädigung wurde in den chronischen Versuchsgruppen (1.) das funktionelle neurologische Defizit, (2.) die Gewichtsentwicklung an 7 postoperativen Tagen sowie (3.) histomorphometrisch die Infarktgröße nach Tötung der Tiere am 7. postoperativen Tag bestimmt. In den akuten Versuchsgruppen wurden die Tiere nach 6-stündiger Ischämie getötet und im Anschluss wurde die Infarktgröße ebenfalls histomorphometrisch quantifiziert.

2.4.1 Quantifizierung des funktionellen neurologischen Defizits

Zur Quantifizierung des funktionellen Defizits wurde täglich ein nach Bederson et al.¹⁶ modifizierter Neuro-Score bestimmt. Der Score wurde von Untersuchern erhoben, die keine Kenntnis von der Therapie hatten. Die Bewertung erfolgte nach folgendem Schema:

- 0 Punkte: Keine Spontanbewegung
- 1 Punkt: Spontanes Circling in Richtung der Hemiparese
- 2 Punkte: Circling nur bei erhöhtem Kraftaufwand (Zug am Schwanz)
- 3 Punkte: Kein Circling, verminderte Standstabilität bei Druck von der Seite
- 4 Punkte: Kein Circling, keine verminderte Standstabilität. Bei Hochheben am Schwanz und Annäherung an den Boden Unfähigkeit, die zum Infarkt kontralaterale Vorderpfote zu strecken (eingeschränkter Stellreflex)
- 5 Punkte: neurologisch unauffällige Versuchstiere

2.4.2 Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens in den chronischen Versuchsgruppen

Am 7. postoperativen Tag wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und mit einer Überdosis KCl getötet. Nach transkardialer Perfusionsfixierung mit Paraformaldehyd (2 %) wurden die Gehirne zur histopathologischen Aufarbeitung entnommen. In 400- μ m-Intervallen wurden 24 Paraffinschnitte mit einer Dicke von 3 μ m auf Objektträger aufgenommen und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Von den 24 Schnitten, die das gesamte Infarktareal enthielten, wurde ipsi- und kontralaterales Hemisphärenvolumen sowie kortikales und subkortikales Infarktvolumen mittels digitaler Planimetrie (OPTIMAS 5.1, BioScan Inc., Edmonds, WA, USA) bestimmt. Das Volumen (V) ergab sich aus der Summe der Schnittflächen (Fn) multipliziert mit dem Abstand (400 μ m) zwischen den Schnitten ($V = 0.4[F_1+F_2+\dots+F_{24}] \text{ mm}^3$). Das Infarktvolumen wurde separat in Kortex und Basalganglien bestimmt. Die Auswertung wurde von einem Untersucher vorgenommen, der keine Kenntnis der Therapie hatte.

2.4.3 Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens in den akuten Versuchsgruppen

Nach medianer Laparotomie und Inzision der linken Herzkammer wurde das Gehirn entnommen und auf Parafilm im Kühlschrank bei -20° für 18-20 Minuten angefroren. Die gefrorenen Gehirne wurden mittels einer Vorrichtung (Rodent Brain Matrix RBM-2000 für Ratten mit 250 - 300 g, ASI-Instruments, Warren, MI, USA) in 8 Scheiben a 2 mm Dicke geschnitten und mit Tetrazoliumchlorid (TTC) angefärbt. Es folgte eine Fixierung mit Paraformaldehyd (4 %). Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Scanners und zugehöriger Software (AGFA Fotolook 2.08, Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien) in einen PC eingelesen und danach mit einer Fotobearbeitungssoftware (Adobe Photoshop 3.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) weiterbearbeitet. Die eingelesenen und bearbeiteten Hirnschnitte wurden digitalisiert und mit einem Planimetrieprogramm (OPTIMATE 6.5, BioScan Inc., Edmonds, WA, USA) analysiert.

Wiederum wurde ipsi- und kontralaterales Hemisphärenvolumen sowie kortikales und subkortikales Infarktvolume bestimmt. Das Volumen (V) ergab sich aus der Summe der Schnittflächen (F_n) multipliziert mit der Schnittdicke (2 mm) ($V = 2[F_1+F_2+...F_8] \text{ mm}^3$). Das Infarktvolume wurde separat in Kortex und Basalganglien bestimmt. (Abb. 2.3)

Um die mittels TTC-Färbung bestimmten Volumina zu evaluieren, wurden die gefärbten Schnitte anschließend in Paraformaldehyd (2 %) eingelegt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die histopathologische Aufarbeitung und planimetrische Berechnung erfolgte wie bei den chronischen Versuchsgruppen. Die mit beiden Färbetechniken erzielten Ergebnisse wurden abschließend korreliert.

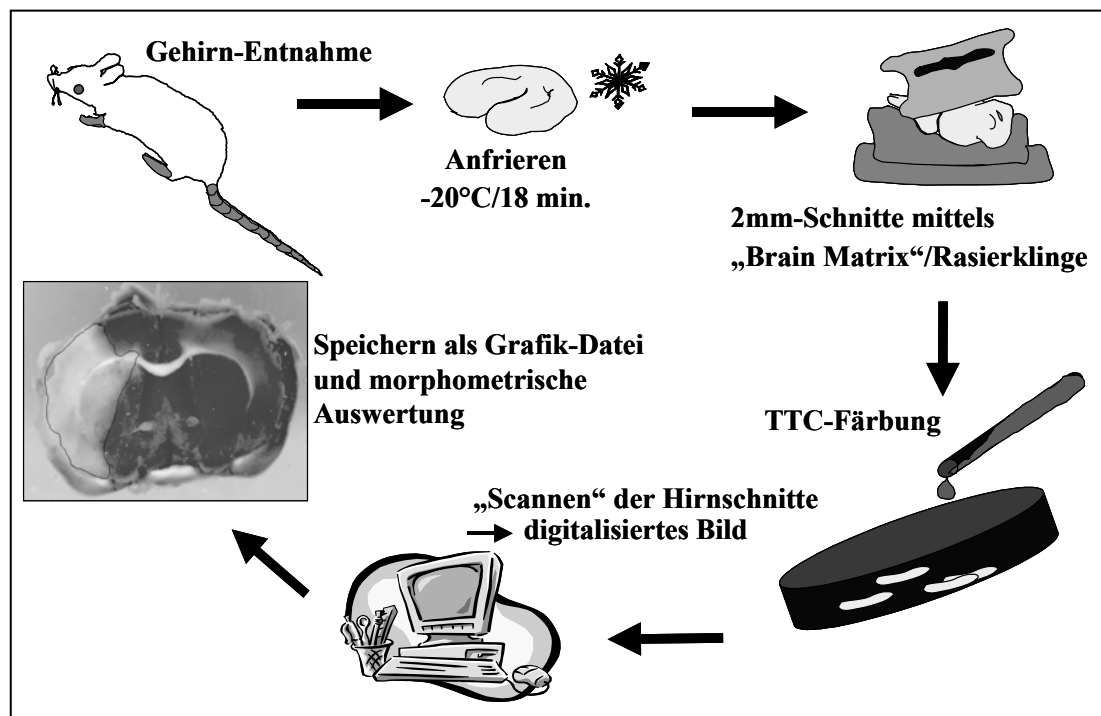


Abbildung 2.3: Quantifizierung des morphologischen Hirnschadens in den Akutgruppen

Schematische Darstellung des Quantifizierungsvorganges von der Hirnentnahme nach 6-stündiger Ischämie bis zur digitalen Fotografie als Grafik-Datei, die im Anschluss mittels digitalisierter Planimetrie weiterverarbeitet wird.

2.5 Experimentelle Gruppen I – temporäre Ischämie

In den experimentellen Gruppen I soll MTH bei Induktion der Mediaokklusion sowie während und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem temporären ischämischen Ereignis hinsichtlich der zerebroprotektiven Wirksamkeit überprüft werden.

2.5.1 MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie

Die Versuchstiere wurden randomisiert einer von 5 Gruppen ((1): n=12, (2)-(4): n=10, (5): n=6)) zugeteilt. Es wurden 56 Sprague-Dawley Ratten verwendet. 4 Tiere starben im Versuchszeitraum. 8 Ratten erlitten intraoperativ eine SAB. Diese Tiere wurden ausgeschlossen. Das Versuchsprotokoll von Teil I ist in Abb. 2.4 schematisch dargestellt.

(1) **Normotherme Kontrollgruppe (37 °C):** Anästhesie mit 0,8 % Halothan in 70 % N₂O und 30 % O₂ für 4.5 - 7.5 Stunden, Dauerinfusion von isotonischer Kochsalzlösung (1 ml/kg/h), rektale und subtemporale Temperatur blieben konstant bei 37,0 °C.

(2) **MTH:** Anästhesie mit 0,8 % Halothan in 70 % N₂O und 30 % O₂ für 4.5 - 7.5 Stunden sowie Gabe von:

MgCl₂ (2x1 mmol/kg) (MgCl₂, Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) als intravenöse Kurzinfusion über 15 Minuten sowie gleiches Volumen **+Tirilazad** (2x3 mg/kg) (Freedox[®], Upjohn, USA), ebenfalls als Kurzinfusion über 15 Minuten, beide Substanzen in Dosierungen, die bei früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe am gleichen Modell verwendet wurden^{128,130,163} **+2 h Hypothermie:** Die Temperatur wurde für 2 Stunden konstant auf 33 °C gehalten und darauf folgte die schrittweise Wiedererwärmung auf 37 °C mit Hilfe einer Wärmeplatte und einer Wärmelampe.

Applikation der Pharmaka und Induktion der Hypothermie:

bei MCA-Okklusion

- (3) **MTH:**
MgCl₂ (2x1 mmol/kg)+ Tirilazad (2x3 mg/kg)+ 2 h Hypothermie
60 min nach MCA-Okklusion
- (4) **MTH:**
MgCl₂ (2x1 mmol/kg)+ Tirilazad (2x3 mg/kg)+ 2 h Hypothermie
180 min nach MCA-Okklusion
- (5) **MTH:**
MgCl₂ (2x1 mmol/kg)+ Tirilazad (2x3 mg/kg)+ 2 h Hypothermie
300 min nach MCA-Okklusion

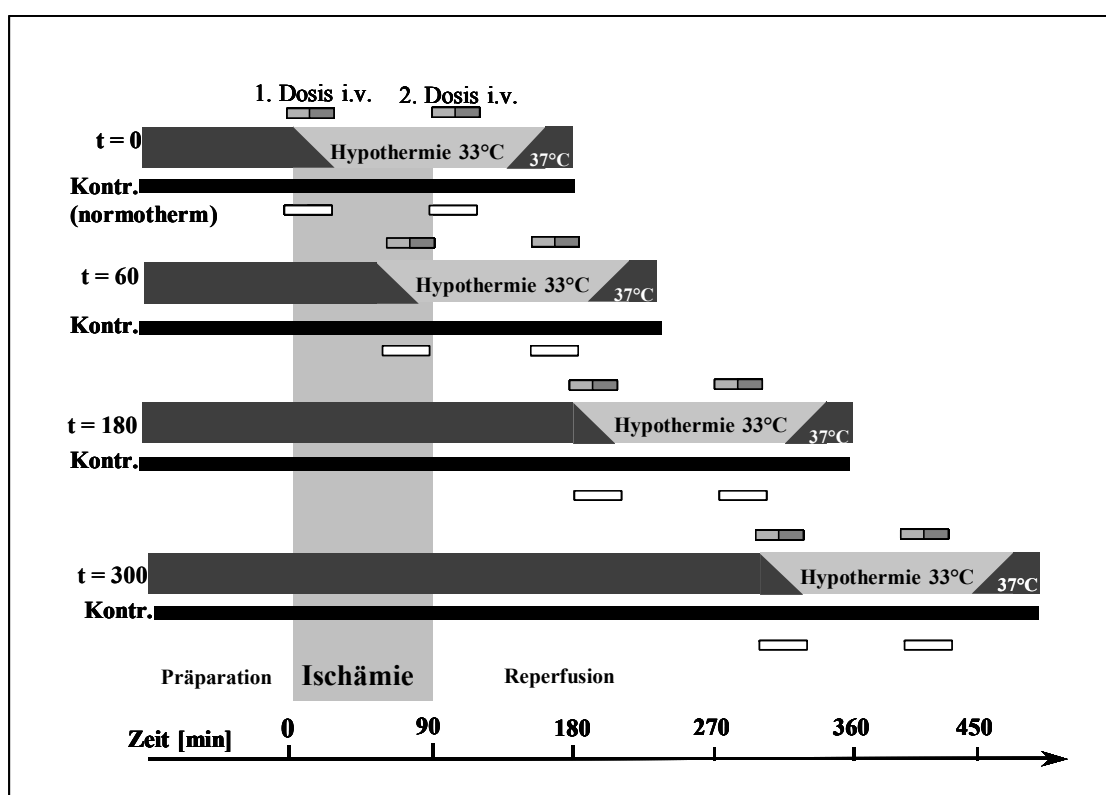


Abbildung 2.4: Versuchsprotokoll 1 – MTH 0, 60, 180 und 300 Minuten nach Induktion einer temporären Ischämie

Nach ca. 90 Minuten chirurgischer Präparation erfolgte die Okklusion der MCA und nach 90 minütiger Ischämie die Reperfusion. Der Laser-Doppler Flow über beiden Mediastromgebieten wurde von mindestens 30 Minuten vor Ischämie bis 30 min nach Wiedererwärmung kontinuierlich aufgezeichnet. Vor Ischämie und danach in stündlichen Abständen wurden Blutentnahmen zur Bestimmung der arteriellen Blutgase und des Blutzuckerspiegels durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Therapie mit jeweils zweimaliger Gabe von Magnesium und Tirilazad und begleitender 2-stündiger Hypothermie durchgeführt.

2.6 Experimentelle Gruppen II – permanente Ischämie

In den experimentellen Gruppen II soll die zerebroprotektive Wirksamkeit von MTH bei einer permanenten Okklusion der A. cerebri media untersucht werden.

2.6.1 Teil A: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – chronische Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden randomisiert einer von 2 Gruppen ((1): n=17, (2): n=12) zugeteilt. Es wurden 33 Sprague-Dawley Ratten verwendet. 13 Tiere starben im Versuchszeitraum. 3 Ratten erlitten intraoperativ eine SAB und 1 Ratte hatte eine insuffiziente Okklusion der A. cerebri media. Diese Tiere wurden ausgeschlossen. Das Versuchsprotokoll von Teil IIA ist in Abb. 2.5 schematisch dargestellt.

(1) Normotherme Kontrollgruppe (37 °C):

Dauerinfusion von isotonischer Kochsalzlösung (1 ml/kg/h)

(2) MTH:

MgCl₂ (2x1 mmol/kg)+ Tirilazad (2x3 mg/kg)+ 2 h Hypothermie
30 min vor MCA-Okklusion

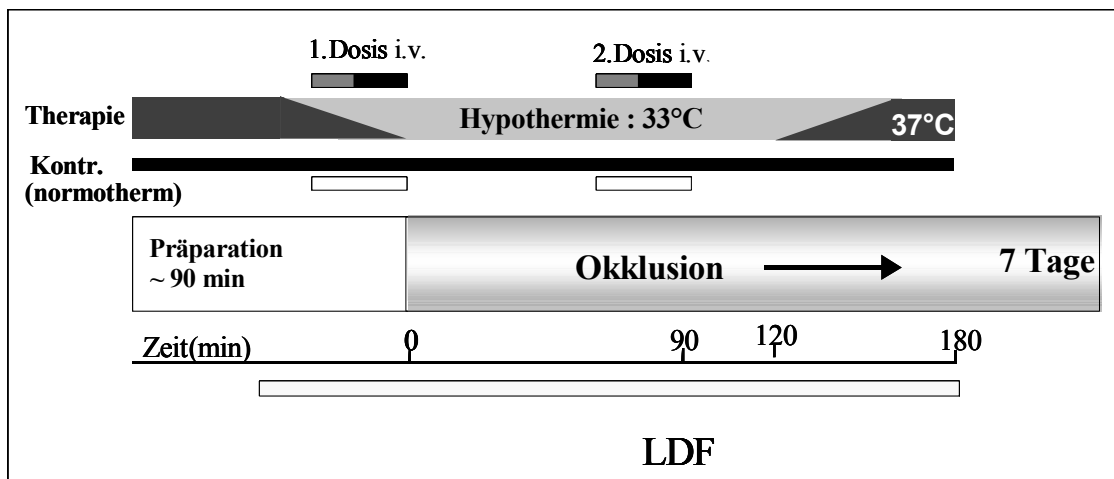


Abbildung 2.5: Versuchsprotokoll 2 – MTH vor Induktion einer permanenten Ischämie, chronische Gruppen

Nach ca. 90 Minuten chirurgischer Präparation erfolgte die permanente Okklusion der MCA mit in situ am Abgang der MCA belassenem Okkluderfaden. Der Laser-Doppler Flow über beiden Mediastromgebieten wurde von mindestens 30 Minuten vor Ischämie bis 180 Minuten nach Okklusion kontinuierlich aufgezeichnet. Vor Ischämie und danach in stündlichen Abständen wurden Blutentnahmen zur Bestimmung der arteriellen Blutgase und des Blutzuckerspiegels durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Therapie mit jeweils zweimaliger Gabe von Magnesium und Tirilazad und begleitender 2-stündiger Hypothermie durchgeführt.

2.6.2 Teil B: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – akute Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden randomisiert einer von 2 Gruppen ((1): n=10, (2): n=10) zugeteilt. Es wurden 22 Sprague-Dawley Ratten verwendet. 2 Ratten erlitten intraoperativ eine SAB und wurden ausgeschlossen. Das Versuchsprotokoll von Teil IIB ist in Abb. 2.6 schematisch dargestellt.

(1) Normotherme Kontrollgruppe (37 °C):

Dauerinfusion von isotonischer Kochsalzlösung (1 ml/kg/h)

(2) MTH:

MgCl₂ (2x1 mmol/kg)+ Tirilazad (2x3 mg/kg)+ 2h Hypothermie
30 min vor MCA-Okklusion

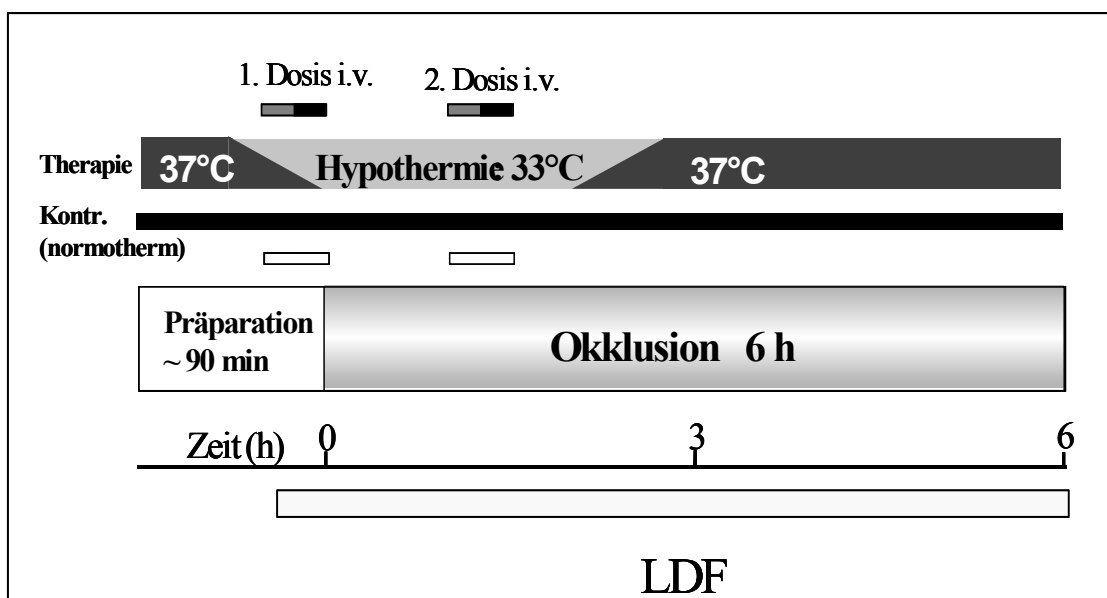


Abbildung 2.5: Versuchsprotokoll 3 – MTH vor Induktion einer permanenten Ischämie, akute Gruppen

Nach ca. 90 Minuten chirurgischer Präparation erfolgte die permanente Okklusion der MCA mit in situ am Abgang der MCA belassenem Okkluderfaden. Der Laser-Doppler-Flow über beiden Mediastromgebieten wurde von mindestens 30 Minuten vor Ischämie bis 6 Stunden nach Okklusion kontinuierlich aufgezeichnet. Vor Ischämie und danach in stündlichen Abständen wurden Blutentnahmen zur Bestimmung der arteriellen Blutgase und des Blutzuckerspiegels durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Therapie mit jeweils zweimaliger Gabe von Magnesium und Tirilazad und begleitender 2-stündiger Hypothermie durchgeführt

2.7. Statistik

In den Ergebnissen wird der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) bzw. der Standard Error of the Mean (SEM) ($MW \pm SD$ o. $MW \pm SEM$) angegeben. Parametrische Daten wurden mit der Varianzanalyse (One Way ANOVA) und unverbundene, nicht-parametrische Daten (Neuro-Score) mit dem Kruskal-Wallis Test (ANOVA ON RANKS) auf Signifikanz geprüft. Nachgeordnete Vergleiche gegen die Kontrolle wurden entsprechend mit dem parametrischen oder nicht-parametrischen Dunnet Test vorgenommen. Für den Vergleich aller Gruppen gegeneinander wurde der Student-Newman-Keul Test verwendet. Die Korrelation der nach TTC- und HE-Färbung gemessenen Infarktvolumina wurde mittels Pearson Product Moment Correlation errechnet. Die Auswertung erfolgte mit SigmaStat 2.0 Statistical Software (Jandel Scientific, San Rafael, California, USA). Die Nullhypothese, d.h. Abwesenheit eines signifikanten Unterschieds zwischen zwei Merkmalen, wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ abgelehnt.

3 Ergebnisse

3.1 Teil I: MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie

Mortalität: Zwei Versuchstiere der Kontrollgruppe starben innerhalb des Beobachtungszeitraums von 7 Tagen. Zwei Tiere der Gruppe 5 (Therapiebeginn 300 Minuten nach Induktion der Ischämie) starben innerhalb eines Tages nach Ischämie. Die Mortalität war in beiden Gruppen an den ersten drei postoperativen Tagen am höchsten. In Anbetracht der Mortalität und fehlender neurologischer Erholung wurde die Gruppe 5 nach 6 Tieren entsprechend den Maßgaben der Genehmigung des Tierversuchsvorhabens terminiert. (Abb. 3.1)

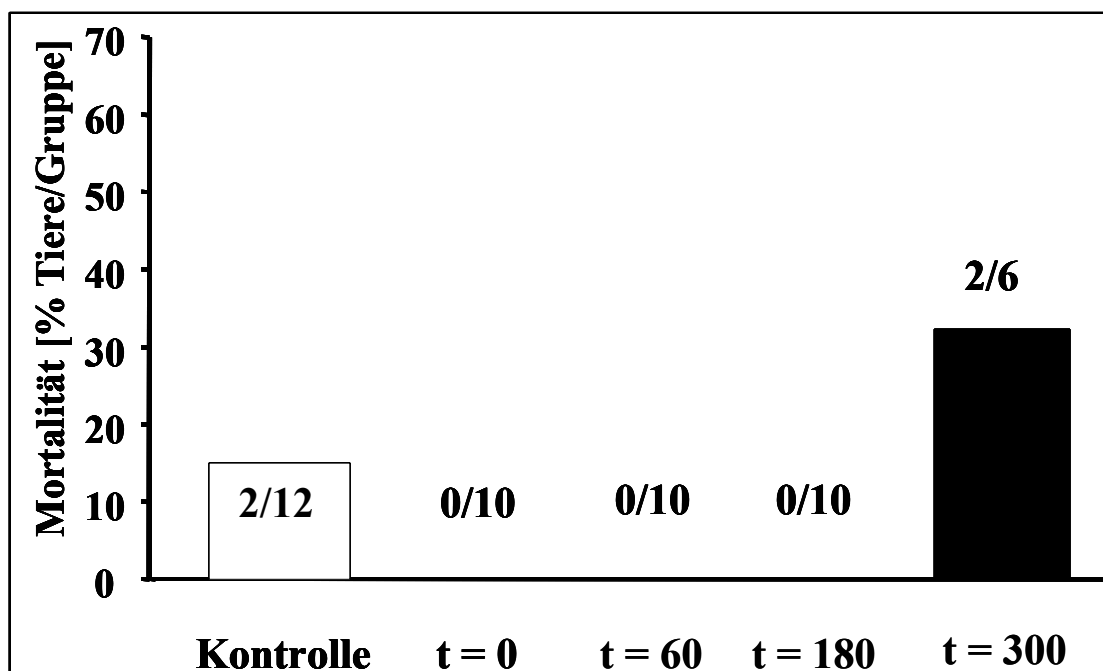


Abbildung 3.1: Postoperative Mortalität

Mortalität während der 7-tägigen Beobachtungsperiode (% Anzahl der Tiere/Gruppe). Lediglich in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit dem spätesten Therapiebeginn verstarben Tiere nach der Operation.

Physiologische Parameter: Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich prä-, intra- und postischämischem arteriellem Blutdruck und Blutgasen. Die Blutglucosespiegel stiegen bei den hypothermen Tieren nach Infusion von $MgCl_2$ signifikant an, während die Blutglucose in den normothermen Kontrolltieren absank. Der Blutdruck fiel während der Infusion von $MgCl_2$ um 10 bis 15 mmHg ab, ohne jedoch die Mittelwerte signifikant zu beeinflussen.

Laser-Doppler Flowmetrie: In der Kontrollgruppe und in den Gruppen, die zu verschiedenen Zeitpunkten mit MTH behandelt worden waren, führte die Okklusion der A. cerebri media zu einem Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 20% des Ausgangswertes, während der kontralaterale LCBF unverändert blieb. Die Reperfusion war begleitet von einer kurzen Hyperämie, gefolgt von einem langsamen Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 70% des Ausgangswertes, der bis zum Ende der postischämischen Aufzeichnungsperiode bestehen blieb. In allen behandelten Gruppen fiel der kontralaterale LCBF während der Abkühlphase signifikant auf ca. 80% des Ausgangswertes ab und erholte sich mit der Erwärmung wieder auf Ausgangswerte. In der Gruppe 2 mit Therapiebeginn zum Zeitpunkt der MCA-Okklusion erholte sich der ipsilaterale LCBF auf ca. 85% des Ausgangswertes zum Zeitpunkt der Reperfusion, während mit Beginn der Erwärmung 30 Minuten später der ipsilaterale LCBF graduell auf Werte von ca. 105% des Ausgangswertes anstieg. Diese Werte waren signifikant höher im Vergleich zu den normothermen Kontrollen. In den Gruppen mit späterer Induktion der Hypothermie fiel der ipsilaterale LCBF während der Kühlung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant um ca. 20% ab und erholte sich mit der Wiedererwärmung auf die Werte vor Hypothermie (ca. 80% des Ausgangswertes), erreichte also einen mit den Kontrolltieren vergleichbaren LCBF. (Abb. 3.2)

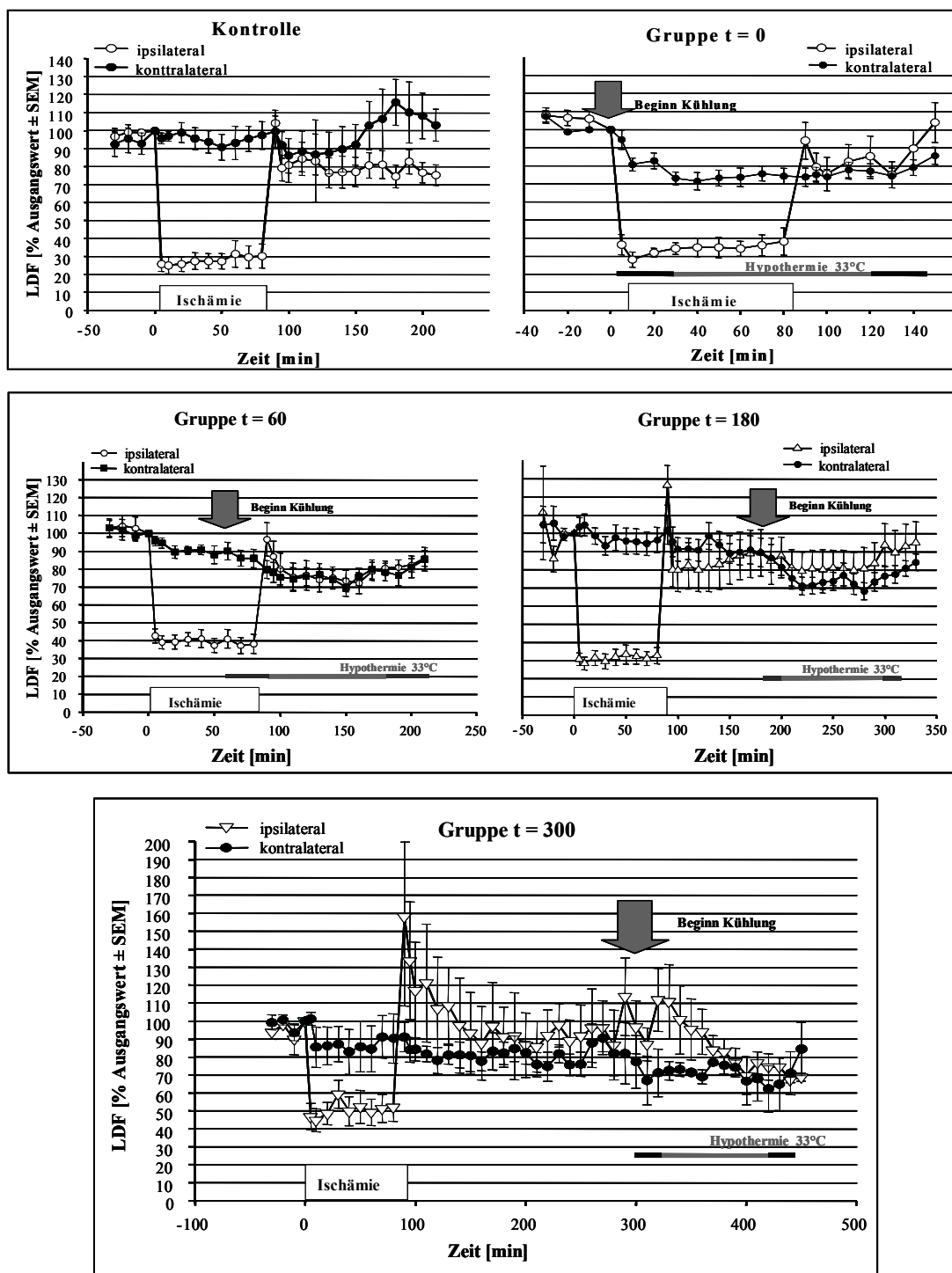


Abbildung 3.2: Laser-Doppler Flowmetrie

Dynamische Veränderungen des ipsilateralen und kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) von vor der Ischämie bis zu 360 Minuten nach Reperfusion (Gruppe $t = 300$), gemessen mittels kontinuierlicher LDF (2 Hz). Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswerts, MW \pm SEM) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten und mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie bzw. Reperfusion. MTH von $t = 0$ min bis $t = 300$ min.

Funktionelle Defizite: Die Daten zeigen eine bessere funktionelle Erholung der Therapiegruppen bis einschließlich $t = 300$ min im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe. Der Effekt war nur in den Gruppen bis $t = 180$ min deutlich ausgeprägt und an den ersten beiden postoperativen Tagen signifikant ($p < 0,05$). (Abb. 3.3)

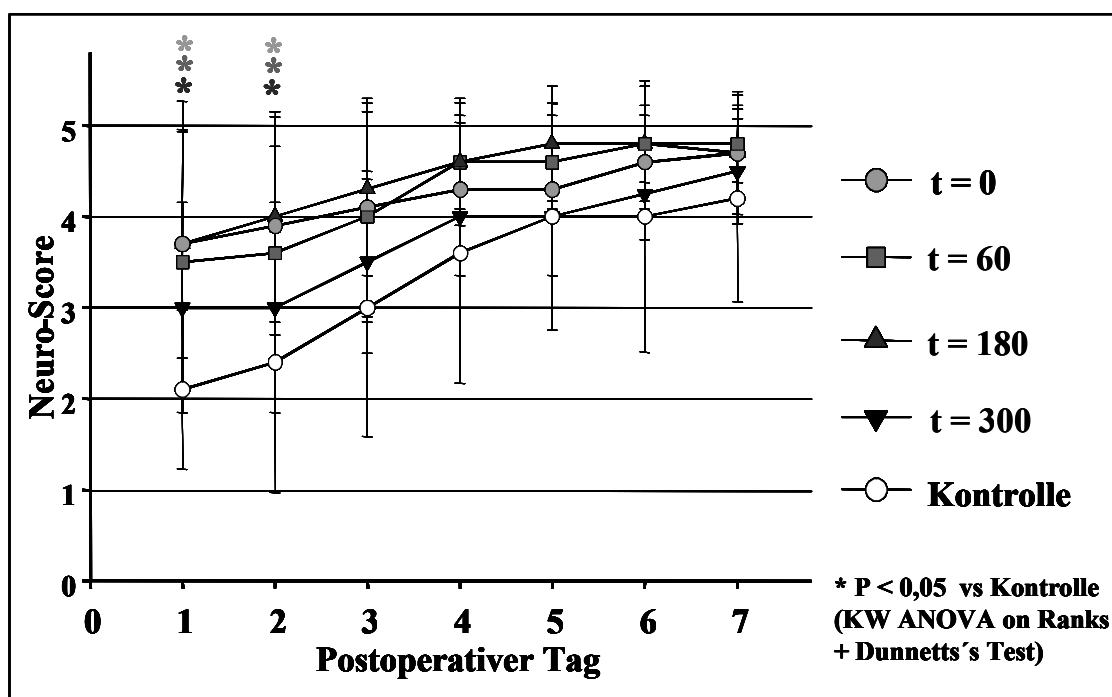


Abbildung 3.3: Neuro-Score

Graphische Darstellung der neurologischen Erholung der Tiere aus der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen an den postoperativen Tagen 1 – 7. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD. An den Tagen 1 und 2 ließ sich bei den Tieren der Gruppen $t = 0$ min, $t = 60$ min und $t = 180$ min ein signifikant besserer neurologischer Befund im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe erheben (ANOVA on ranks, Dunnett Test, $p < 0,05$).

Infarktvolumina: Die Wirksamkeit von MTH auf die funktionelle neurologische Erholung der Tiere spiegelt sich auch im Infarktvolumen wieder. Betrachtet man zunächst die Gesamtfarktvolumina, so ergab sich bei den zum Zeitpunkt $t = 0$ min therapierten Tieren eine signifikante Infarktreduktion um 74 %, die sich graduell bis zum Therapiebeginn nach 300 Minuten verminderte und danach nicht mehr signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe war.

Das *Gesamtfarktvolumen* betrug $84,5 \pm 37,3 \text{ mm}^3$ (MW \pm SD) bei den Kontrolltieren, $21,9 \pm 17,7 \text{ mm}^3$ (- 74 %) bei der Gruppe $t = 0$ min, $43,1 \pm 30,3 \text{ mm}^3$ (- 49 %) bei der Gruppe $t = 60$ min, $46,7 \pm 42,4 \text{ mm}^3$ (- 45 %) bei der Gruppe $t = 180$ min und $62,2 \pm 31,1 \text{ mm}^3$ (- 26 %) bei der Gruppe $t = 300$ min. Die Behandlung mit MTH zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, $t = 60$ min, $t = 180$ min und $t = 300$ min reduzierte das Gesamtfarktvolumen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. * $P = 0,004$ vs. Kontrolle Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks + Dunnetts's Test. (Abb. 3.4)

Das *kortikale Infarktvolumen* betrug $40,1 \pm 26,2 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren, $5,4 \pm 11,3 \text{ mm}^3$ (- 87 %) bei der Gruppe $t = 0$ min, $12,6 \pm 18,1 \text{ mm}^3$ (- 69 %) bei der Gruppe $t = 60$ min, $14,5 \pm 26,4 \text{ mm}^3$ (- 64 %) bei der Gruppe $t = 180$ min und $38,3 \pm 21,2 \text{ mm}^3$ (- 5 %) bei der Gruppe $t = 300$ min. Die Behandlung mit MTH zu den Zeitpunkten $t = 0$ min, $t = 60$ min und $t = 180$ min reduzierte das kortikale Infarktvolumen signifikant (* $P = 0,005$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das *Infarktvolumen in den Basalganglien* wurde verglichen mit $40,7 \pm 17,3 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren in der Gruppe $t = 0$ min mit $15,5 \pm 11,7 \text{ mm}^3$ (- 59 %) signifikant reduziert (* $P = 0,025$). Eine weitere Verzögerung der Behandlung um 1 bis 5 Stunden führte zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktvolumina in den Basalganglien ($27,6 \pm 10,1$ bis $30,5 \pm 16,2 \text{ mm}^3$ (- 25 bis - 32 %). (Abb. 3.5)

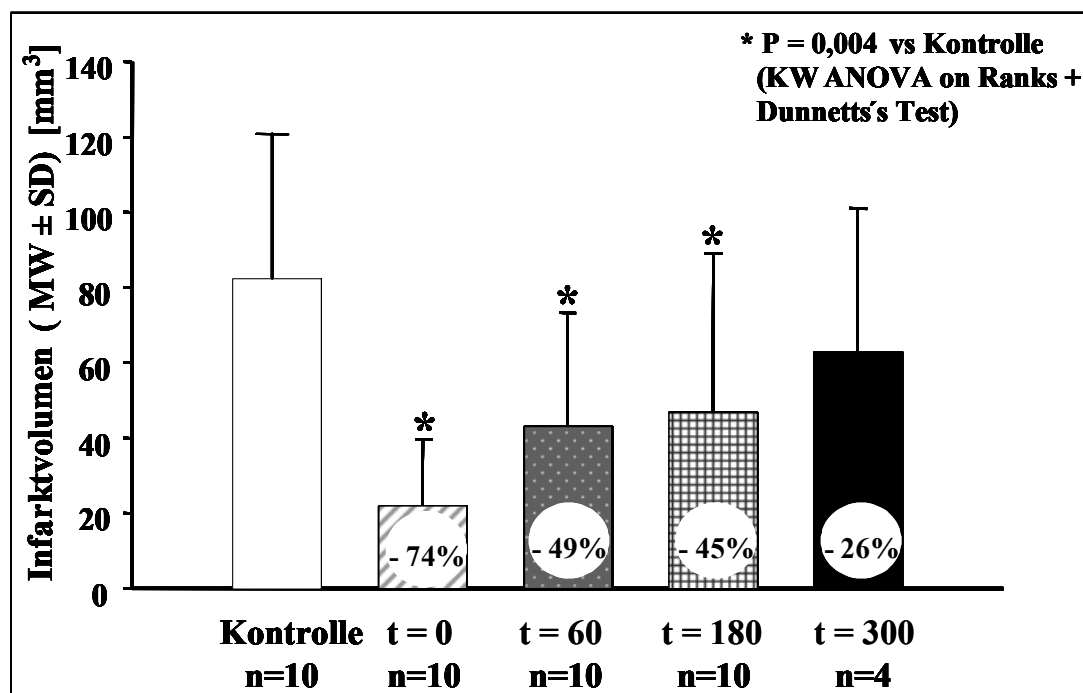


Abbildung 3.4: Gesamtfarkt volumina

Reduktion des Gesamtfarkt volumens (MW ± SD) in jeder Gruppe am 7. postoperativen Tag. * p = 0,004 vs. Kontrolle, Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks + Dunnett Test

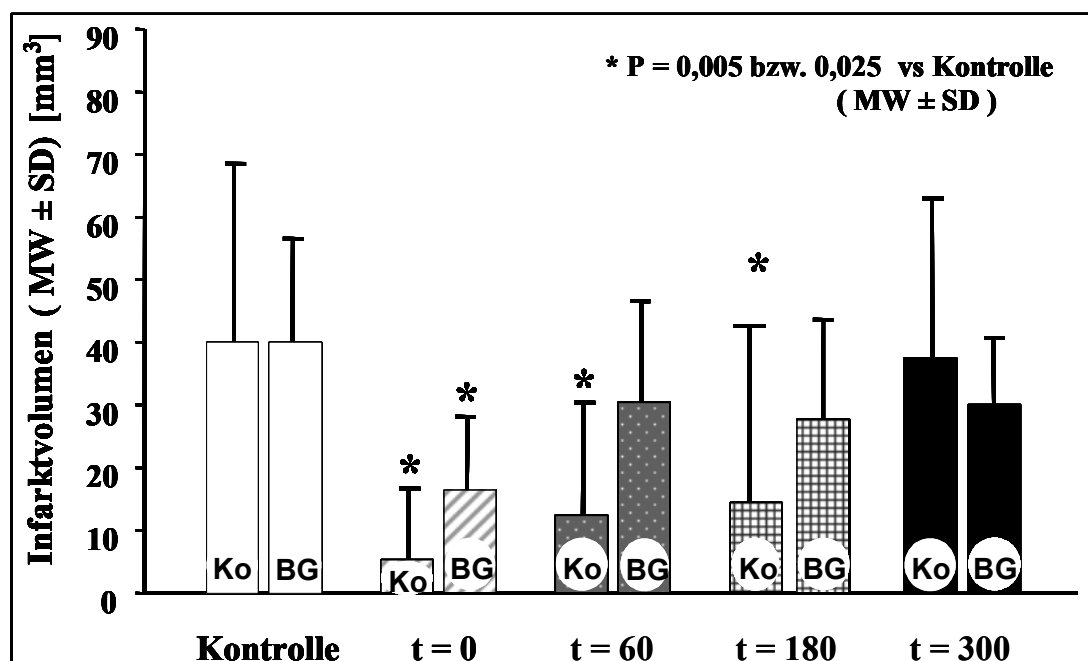


Abbildung 3.5: Infarkt volumina in Kortex und Basalganglien

Reduktion des Infarkt volumens (MW ± SD) in Kortex (Ko) und in den Basalganglien (BG) am 7. postoperativen Tag. * p = 0,005 bzw. 0,025 vs. Kontrolle, Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks + Dunnett Test.

3.2 Teil IIA: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie - chronische Versuchsgruppen

Mortalität: In beiden Versuchsgruppen zeigte sich eine hohe, nicht signifikant unterschiedliche Mortalität. 5 von 12 Tieren der Kontrollgruppe (42,6 %) und 8 von 17 Tieren der Therapiegruppe (47 %) starben innerhalb des einwöchigen Beobachtungszeitraums. In beiden Gruppen war die Mortalität an den ersten drei postoperativen Tagen am höchsten.

Physiologische Parameter: Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich prä-, intra- und postischämischem arteriellem Blutdruck und Blutgasen. Die Blutglucosespiegel stiegen bei den hypothermen Tieren nach Infusion von $MgCl_2$ signifikant an, während die Blutglucose in den normothermen Kontrolltieren absank. Der Blutdruck fiel während der Infusion des $MgCl_2$ um 10 bis 15 mmHg ab, ohne jedoch die Mittelwerte signifikant zu beeinflussen.

Laser-Doppler Flowmetrie: In der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit MTH behandelt worden war, führte die Okklusion der A. cerebri media zu einem Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 20% des Ausgangswertes, während der kontralaterale LCBF unverändert blieb. Dies wurde bis 180 Minuten nach der Okklusion durch die LDF kontrolliert. In der behandelten Gruppe fiel der ipsi- und kontralaterale LCBF während der Abkühlphase auf ca. 80% des Ausgangswertes ab. Der kontralaterale LCBF erreichte in der Aufwärmphase seinen Ausgangswert.

Funktionelle Defizite und Gewichtsentwicklung: Die Daten zeigen ab dem 4. postoperativen Tag eine bessere funktionelle Erholung der Therapiegruppe im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe. Der Effekt wird am 6. und 7. postoperativen Tag signifikant ($p < 0,05$). (Abb. 3.6)

Zusätzlich war bei den therapierten Tieren eine bessere Gewichtszunahme zu verzeichnen, die am 7. postoperativen Tag die Signifikanz erreichte. (Abb. 3.7)

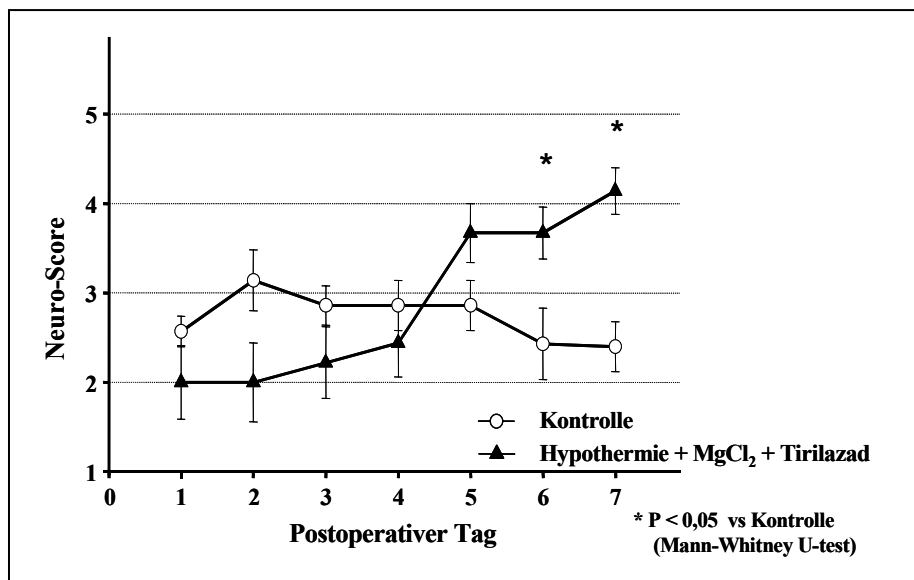


Abbildung 3.6: Neuro-Score

Graphische Darstellung der neurologischen Erholung der Tiere aus der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe an den postoperativen Tagen 1 – 7. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SD. An den Tagen 6 und 7 zeigen die behandelten Tiere einen signifikant besseren neurologischen Status als die Tiere der Kontrollgruppe (* p < 0,05, Mann-Whitney U-Test).

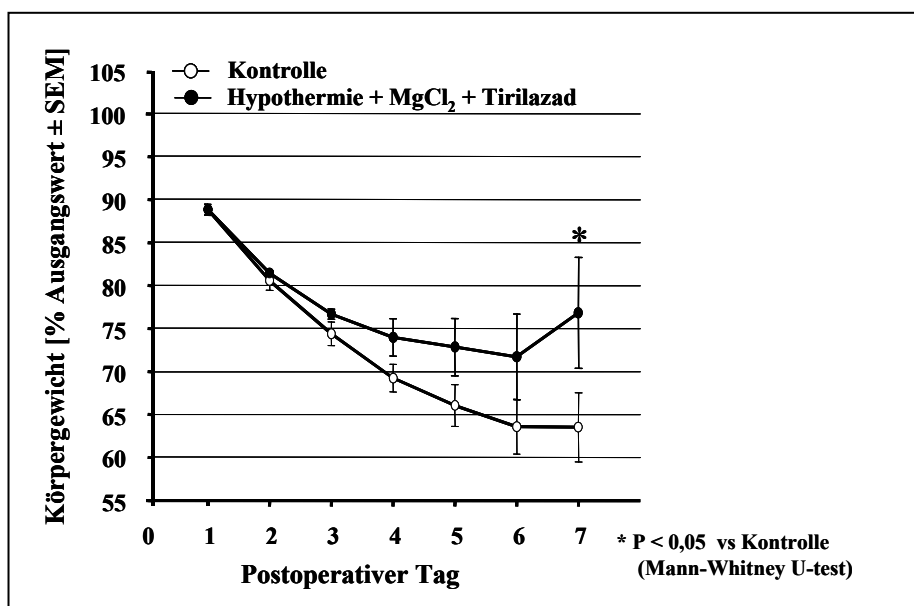


Abbildung 3.7: Gewichtsentwicklung

Graphische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere an den postoperativen Tagen 1 - 7. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Am Tag 7 zeigen die Tiere in der Gruppe mit MTH eine signifikant verbesserte Gewichtsentwicklung als die Tiere der Kontrollgruppe (* p < 0,05, Mann-Whitney U-Test).

Infarkt volumina: Weder im Gesamtfarkt volumen noch in den Teilinfarkt volumina von Kortex und Basalganglien zeigte sich eine signifikante Infarkt reduktion bei den mit MTH behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das *Gesamtfarkt volumen* betrug $126,6 \pm 46,9 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren und $146,8 \pm 58,4 \text{ mm}^3$ bei den therapierten Tieren.

Das *kortikale Infarkt volumen* betrug $59,6 \pm 37,8 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren und $85,4 \pm 39,1 \text{ mm}^3$ bei den therapierten Tieren.

Die Morphometrie des *Infarkt volumens in den Basalganglien* ergab ein Infarkt volumen von $65,2 \pm 11,3 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe, in der Therapiegruppe ein Volumen von $60,3 \pm 17,7 \text{ mm}^3$. (Abb. 3.8)

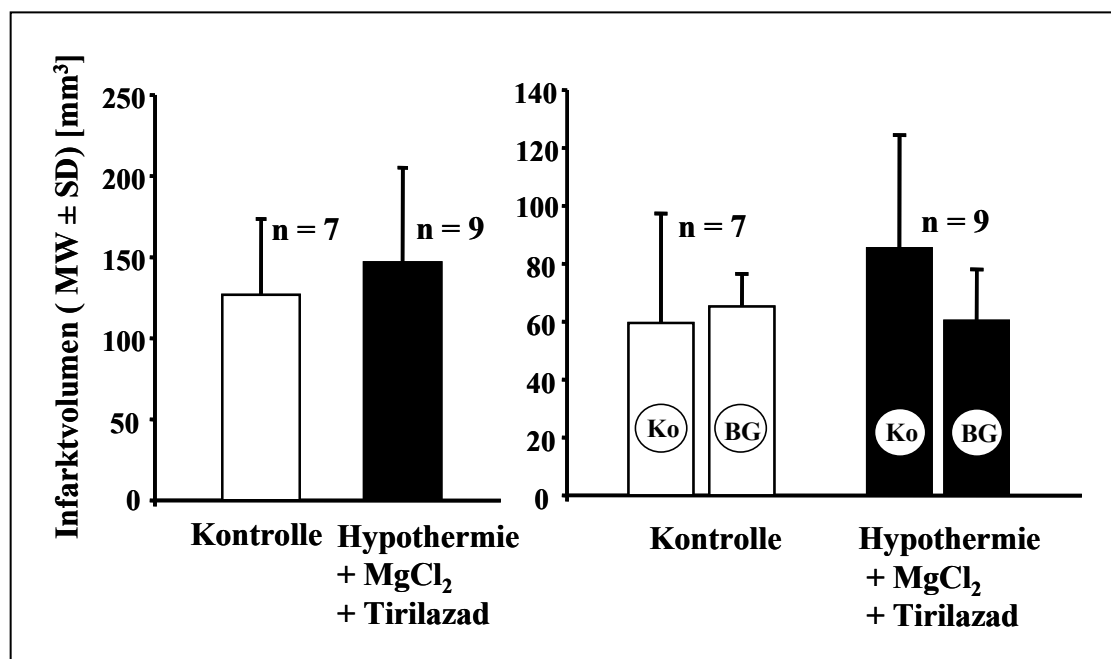


Abbildung 3.8: Gesamtfarkt volumina sowie Infarkt volumina in Kortex und Basalganglien (HE - Färbung)

Gesamtfarkt volumen (MW ± SD) sowie Infarkt volumen (MW ± SD) in Kortex (Ko) und in den Basalganglien (BG) am 7. postoperativen Tag. Weder beim Vergleich der Gesamtfarkt volumina noch beim Vergleich der Infarkt volumina in Kortex (Ko) und in den Basalganglien (BG) am 7. postoperativen Tag zeigten sich signifikante Unterschiede.

3.3 Teil IIB: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie - akute Versuchsgruppen

Physiologische Parameter: Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich prä-, intra- und postischämischem arteriellem Blutdruck und Blutgasen. Die Blutglucosespiegel stiegen bei den hypothermen Tieren nach Infusion von $MgCl_2$ signifikant an, während die Blutglucose in den normothermen Kontrolltieren absank. Der Blutdruck fiel während der Infusion des $MgCl_2$ um 10 bis 15 mmHg ab, ohne jedoch die Mittelwerte signifikant zu beeinflussen.

Laser-Doppler Flowmetrie: In der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit MTH behandelt worden war, führte die Okklusion der A. cerebri media zu einem für die Zeit des 6-stündigen kontinuierlichen Monitorings anhaltenden Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 20% des Ausgangswertes, während der kontralaterale LCBF unverändert blieb. In der behandelten Gruppe fiel der ipsi- und kontralaterale LCBF während der Abkühlphase auf ca. 80% des Ausgangswertes ab. Der kontralaterale LCBF erreichte in der Aufwärmphase seinen Ausgangswert. (Abb. 3.9)

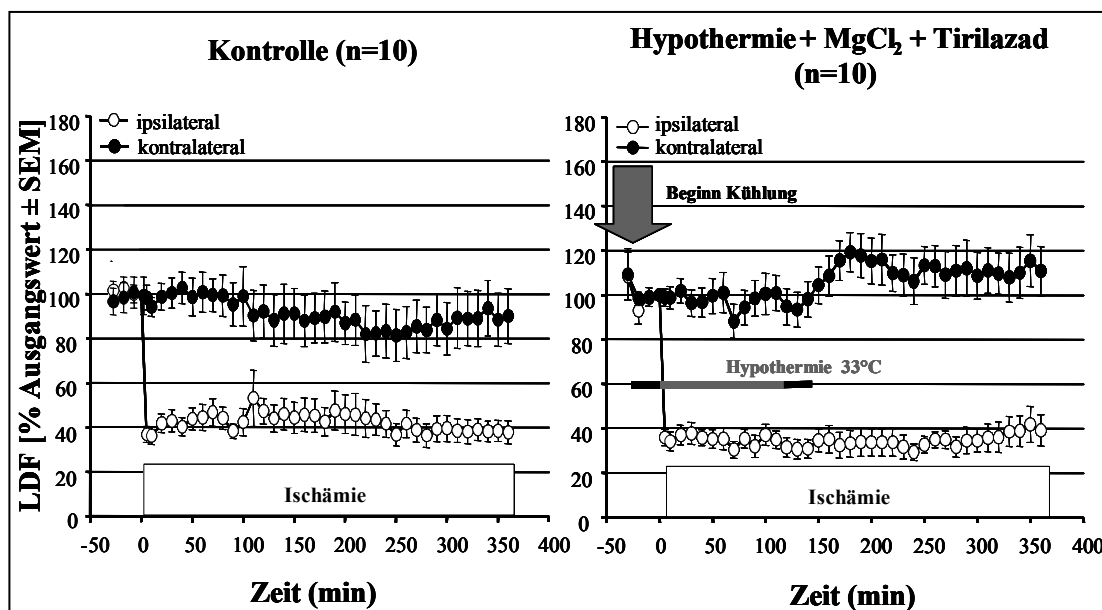


Abbildung 3.9: Laser-Doppler-Flowmetrie

Dynamische Veränderungen des ipsilateralen und kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) von vor und bei 6-stündiger Ischämie, gemessen mittels kontinuierlicher LDF (2 Hz). Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswertes, MW ± SEM) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten und mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie.

Infarkt volumina: Nach 6-stündiger Ischämie und anschließender TTC-Färbung der Gehirnschnitte ergab sich eine signifikante Reduktion des Gesaminfarkt volumens um 52 % bei den mit MTH behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das *Gesamtinfarkt volumen* der Kontrollgruppe betrug $176,54 \pm 66,15 \text{ mm}^3$ (MW \pm SD), das der Therapiegruppe $87,54 \pm 100,12 \text{ mm}^3$ (MW \pm SD).

Das *kortikale Infarkt volumen* betrug $83,08 \pm 72,8 \text{ mm}^3$ bei den Kontrolltieren und $49,32 \pm 69,40 \text{ mm}^3$ bei den therapierten Tieren.

Die Morphometrie des *Infarkt volumens in den Basalganglien* ergab ein Infarkt volumen von $94,07 \pm 35,36 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe, in der Therapiegruppe ein Volumen von $37,03 \pm 33,05 \text{ mm}^3$. (Abb. 3.10)

Daneben konnte gezeigt werden, dass die nach 6 Stunden mittels TTC-Färbung ermittelten Infarkte eine signifikante Korrelation zu den aus den gleichen Hirnschnitten bestimmten Infarkt volumina nach anschließender HE-Färbung aufwiesen. Der Korrelationskoeffizient r^2 betrug 0,97. (Abb. 3.11)

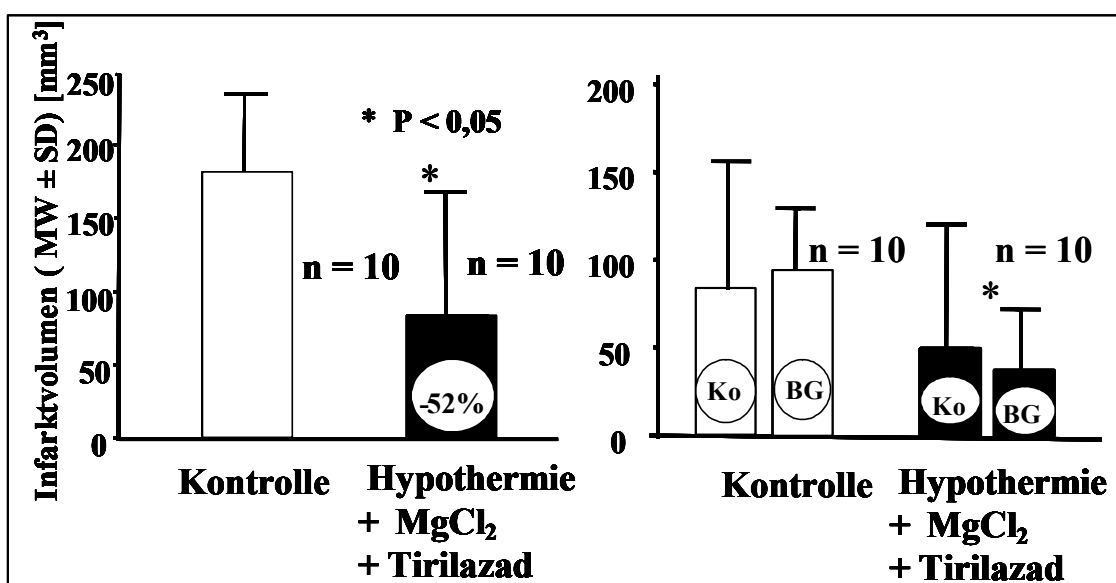


Abbildung 3.10: Gesaminfarkt volumina sowie Infarkt volumina in Kortex und Basalganglien (TTC – Färbung)

*Gesamtinfarkt volumen (MW \pm SD) sowie Infarkt volumen (MW \pm SD) in Kortex (Ko) und in den Basalganglien (BG) nach 6-stündiger permanenter, LDF-kontrollierter fokaler Ischämie. * p < 0,05 vs. Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.*

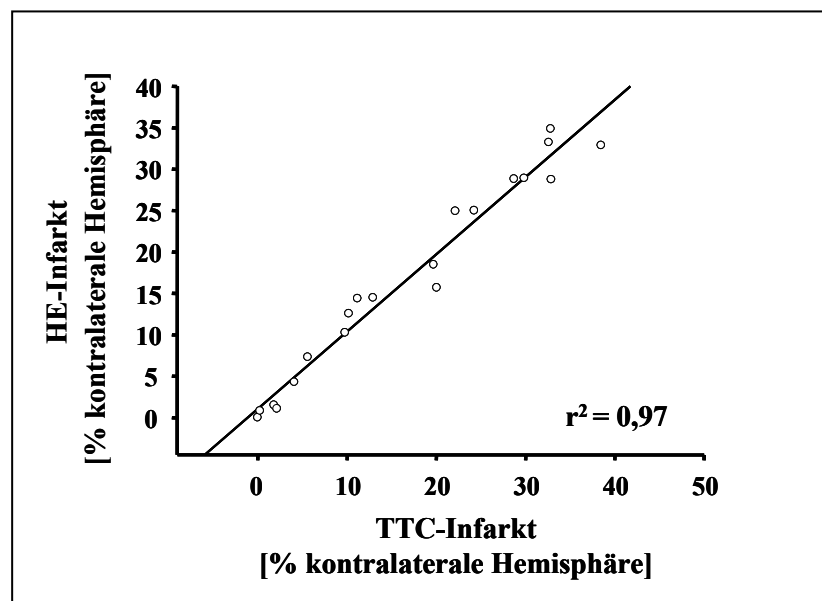


Abbildung 3.11: Korrelation der mit TTC vs. HE ermittelten Infarktvolumina

Deutliche Korrelation der aus den gleichen, nach 6 Stunden mit TTC und anschließend mit HE angefärbten Gehirnschnitten ermittelten Infarktvolumina (% kontralaterale Hemisphere)

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Das intraluminale Fadenmodell

1986 wurde von Koizumi et al.⁸⁵ ein neues Modell zur Induktion einer fokalen Ischämie bei Ratten beschrieben und später von Longa et al.⁹¹ modifiziert. Bei diesem Modell wird ein Nylonfaden über die A. carotis nach intrakraniell bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben und das Gefäß auf diese Weise okkludiert.

Inzwischen avancierte das intraluminale Fadenmodell zum weltweit etabliertesten Tiermodell zur Untersuchung pathophysiologischer Zusammenhänge und therapeutischer Strategien bei permanenter und temporärer fokaler zerebraler Ischämie. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen der fokalen Ischämie, wie z. B. dem 1981 von Tamura et al.^{151,152} beschriebenen Modell, bei dem eine Kraniotomie nötig ist, um den proximalen Abschnitt der A. cerebri media zu verschließen, oder dem von Busch et al.²¹ publizierten Modell, bei dem ein autologer Thrombus in die A. carotis injiziert wird, bietet dieses Modell einige Vorteile: (1) Die Operationstechnik ist minimal invasiv. (2) Eine Kraniotomie, die die Hirntemperatur sowie den intrakraniellen Druck, die Liquorzirkulation und die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen würde, ist nicht erforderlich. Dies ist besonders auch bei Versuchen mit Hypothermie vorteilhaft. (3) Eine Rezirkulation durch Zurückziehen des Fadens ist problemlos erreichbar. Bei permanenter Okklusion wird der Faden im Gefäß belassen und daran befestigt. (4) Abfall der zerebralen Durchblutung und Infarzierung sind zuverlässig zu reproduzieren. (5) Im Gegensatz zum von Busch et al.²¹ verwendeten autologen Thrombus wird das Nylonmaterial des Okkluderfadens nicht von körpereigenen Lysemechanismen angegriffen.

Allerdings beinhaltet dieses Modell auch einige potentielle Fehlerquellen wie (1) eine iatrogene Subarachnoidalblutung (SAB) durch Perforation der Gefäßwand mit dem Okkluderfaden, (2) ein primär insuffizienter Verschluss der A. cerebri media, (3) eine spontane Dislokation des Okkluderfadens mit vorzeitiger Rezirkulation, (4) eine Thrombosierung im verschlossenen Gefäß bzw. eine ausbleibende Reperfusion oder (5) eine postischämische Hyperthermie. Diese Komplikationen wären eine Erklärung für die in der Literatur berichtete Variabilität der Ergebnisse mit diesem Modell.¹²⁹

Teil I: Intraluminales Fadenmodell und temporäre Ischämie: Durch einige Modifikationen am Modell war es uns möglich, die Komplikationsrate bei den Versuchen mit temporärer Ischämie zu senken und ein zuverlässiges Monitoring des Gefäßverschlusses zu gewährleisten.¹²⁹ SAB oder unvollständige Okklusionen konnten durch die Silikonumhüllung am vorderen Ende des Okkluderfadens, die über die Fadenspitze hinausreicht, und durch zusätzliches Abstumpfen des Fadens auf ein Minimum reduziert werden. SAB, vorzeitige oder ausbleibende Reperfusionen werden mittels kontinuierlicher bilateraler Laser-Doppler Flowmetrie zuverlässig erkannt. Bereits vor Erreichen einer vollständigen Reperfusion kann der Faden replaziert und die Ischämie aufrechterhalten werden. Bei ausbleibender Reperfusion wurden die Versuchstiere ausgeschlossen. Zudem konnten wir zeigen, dass eine Hyperthermie bei Sprague-Dawley Ratten nicht auftritt, wenn die Ischämie auf 90 Minuten limitiert ist.¹²⁹ Außerdem war es in Vorversuchen bei unserem Versuchsaufbau zu keiner Thrombosierung des verschlossenen Gefäßes gekommen.¹²⁹

Teil IIA: Intraluminales Fadenmodell und permanente Ischämie –

chronische Versuchsgruppen: Auch für die permanente Ischämie ist das intraluminale Fadenmodell etabliert und weit verbreitet.^{82,85,91} Hierbei wird der okkludierende Faden vor dem Abgang der A. cerebri media plaziert und im Gegensatz zur temporären Ischämie dort bis zur Tötung der Tiere belassen, in Teil IIA dieser Arbeit für 7 postoperative Tage. Die meisten Untersucher arbeiten bei diesem Modell jedoch mit Akutgruppen, bei denen die Tiere bis zur Tötung in Narkose gehalten werden,^{38,157} oder mit kürzeren Überlebenszeiten im Bereich von 1 bis 3 Tagen.^{48,82,91,102,159}

Im Teil IIA unserer Experimente zeigte sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe eine hohe und nicht signifikant unterschiedliche Mortalität (42.6% vs. 47%). Für diese Mortalität gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

(1) Es konnte gezeigt werden, dass sich bei einem permanenten Verschluss der A. cerebri media größere Infarkte entwickeln als bei temporärer Ischämie und Verschlusszeiten unter 3 Stunden.^{82,142} Proportional zur Infarktgröße lässt sich auch eine stärkere Ödemkomponente nachweisen, die im kernspintomographischen Nachweis nach 24 Stunden etwa 24% des Volumens einnimmt.⁹² Die Ödembildung hat einen potentiell letalen Anstieg des intrakraniellen Drucks zur Folge. Da die Mortalität in unseren Versuchsgruppen am ersten und zweiten postoperativen Tag, dem Zeitpunkt der maximalen Hirnödemausbreitung,¹⁴² am höchsten war und sich auch bei der Sektion der verstorbenen Tiere Hinweise auf eine starke Hirnschwellung ergaben, ist die Ödembildung aufgrund der Infarzierung als eine mögliche Ursache der hohen Mortalität denkbar.

(2) Bei 3 Tieren war nach dem Tod am 1. postoperativen Tag und anschließender Sektion eine SAB festzustellen, die auf eine Perforation der intrakraniellen A. carotis interna bei im Gefäß liegenden Faden zurückgeführt werden könnte. Eine Subarachnoidalblutung führt zu einem massivem Anstieg des intrazerebralen Drucks und einer globalen Ischämie, welche mit einer hohen Mortalität verbunden ist.¹⁵ Bei den 7 Tage überlebenden Tieren war keine SAB festzustellen. Eine SAB wäre jedoch mittels LDF erfasst worden.¹²⁹ Die Gefäßperforation muss folglich nach Ende der Monitoringphase aufgetreten sein.

(3) Eine weitere Ursache könnte eine verzögert aufgetretene Dislokation des Fadens mit Reperfusion im Stromgebiet der Art. cerebri media sein, was mit einem erheblichen Reperfusionsschaden und nachfolgender Hirnschwellung einhergehen würde.⁷

Teil IIB: Intraluminales Fadenmodell und permanente Ischämie – akute

Versuchsgruppen: Sowohl eine Gefäßperforation mit anschließender SAB als auch eine verzögerte Reperfusion sind bei diesem Modell als Ursache der hohen Mortalität in Teil IIA zu diskutieren. Diese Artefakte würden mittels Laser-Doppler Flowmetrie nur während der Monitoringphase und nicht während des postoperativen Beobachtungszeitraums erfasst werden. Um die Wirksamkeit der Kombinationstherapie unter Ausschluß oben beschriebener Artefakte beurteilen zu können und ein Therapieversagen bei permanenter Ischämie auszuschließen, führten wir zur Evaluation der eigenen Ergebnisse aus Teil IIA eine zweite Versuchsreihe IIB mit kontrollierter 6-stündiger Ischämie durch. Während der gesamten sechs Stunden wurde die beidseitige Perfusion mittels Laser-Doppler Flowmetrie überwacht, so dass eine Subarachnoidalblutung bzw. Reperfusion durch Dislokation des Fadens ausgeschlossen werden konnte. In Tiermodellen erhobene Daten machen deutlich, dass es schon 5 Minuten nach Induktion einer Ischämie zu einem irreversiblen Zellschaden kommt, der nach 6 Stunden sein Maximum erreicht, so daß die Effekte einer permanenten Ischämie nach 6-stündiger Okklusionsdauer gut abgebildet werden können.^{7,67,79,98}

4.1.2 Laser-Doppler Flowmetrie

Die Laser-Doppler Flowmetrie misst mittels Doppler-Effekt die Frequenzänderung von Laserlicht mit einer Wellenlänge von 820 nm durch rote Blutzellen. Der Laser-Doppler Flow wird im Wesentlichen aus dem Produkt der Konzentration der Erythrozyten im gemessenen Gewebeareal und der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten errechnet.⁴⁶ Die Messung der Hirndurchblutung mittels Laser-Doppler Flowmetrie liefert keine absoluten Werte wie die Bestimmung durch radioaktive Mikrosphären, Autoradiographie

oder Clearance-Methoden, sondern zeigt relative Änderungen der Mikrozirkulation in einem kleinen Gewebavolumen von ca. 1 mm^3 .^{36,47} Die Vorteile der Laser-Doppler Flowmetrie liegen darin, dass Änderungen der Durchblutung kontinuierlich verfolgt werden können. Die hohe zeitliche Auflösung (2 Hz) ermöglicht promptes Reagieren beim Verschieben des Okkluderfadens zur Okklusion oder bei unerwarteten vorzeitigen Reperfusionen, da sofort eine Replazierung des Fadens möglich ist. Am Gehirn konnte unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine gute Korrelation der LDF-Werte mit radioaktiven Mikrosphären,⁴¹ Wasserstoff-Clearance⁵⁷ und Autoradiographie³⁶ nachgewiesen werden.

4.1.3 Neuro-Score

Zur Quantifizierung der Hirnschädigung nach zerebraler Ischämie und der Wirkung neuroprotektiver Maßnahmen wird meistens das Infarktvolumen als Hauptkriterium herangezogen. Anhand der Infarktbestimmung ist es allerdings nicht möglich, weitaus subtilere Formen neuronalen Schadens und neuronaler Dysfunktion zu erkennen. Schäden an nicht-homogenen Zellpopulationen, wie sie beispielsweise im Striatum vorkommen, oder an Dendriten im Sinne einer Verminderung der synaptischen Übertragung oder eines Verlustes an Strukturproteinen, lassen sich mit einem rein histologischen Ansatz nicht beurteilen. Deshalb ist es insbesondere bei längeren Überlebenszeiten wichtig, den funktionellen Status der Versuchstiere zu erheben.³³ Außerdem ist in der Klinik die neurologische Erholung und nicht das Infarktvolumen das ausschlaggebende Kriterium.

Der von uns erhobene Neuro-Score¹⁶¹ beurteilt die motorischen Defizite der Tiere und wurde in Anlehnung an den von Bederson et al. beschriebenen Score¹⁶ modifiziert. Bei sämtlichen von unserer Gruppe durchgeführten Experimenten zur temporären Ischämie bestand eine gute Korrelation zwischen dem Infarktvolumen (vor allem dem kortikalen Infarktvolumen) und der funktionellen Erholung an den 7 postoperativen Tagen.¹⁶¹

4.1.4 Infarktvolumina

Sowohl bei den Versuchen mit temporärer Ischämie als auch bei den chronischen Versuchen mit permanenter Ischämie wurden die Gehirne am 7. postoperativen Tag entnommen. Es wurden 24 mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte angefertigt, die das gesamte Infarktareal enthielten. Für eine exakte Bestimmung des Infarktvolumens wird ein Minimum von acht repräsentativen Schnitten gefordert.¹¹⁵

Bei den akuten Experimenten mit permanenter Ischämie wurden die Hirne nach 6 Stunden entnommen und nach Färbung mit Tetrazoliumchlorid (TTC) 8 Schnitte angefertigt. Verschiedene Studien zeigten, dass es beim intraluminalen Fadenmodell nach 6 Stunden Okklusion zu keiner wesentlichen Vergrößerung des Infarktvolumens durch weitere Verlängerung der Okklusionsdauer kommt.^{7,89,92} Lin et al.⁸⁹ zeigten, dass bei direkter Infarktbestimmung durch Mitberechnung der sich an den ersten drei Tagen nach Ischämie entwickelnden Ödemkomponente die Infarktgröße, die an sich gleich bleibt, überschätzt wird. Dies konnte durch die vom Ausmaß des Ödemes unabhängige indirekte Infarktmessung, die keine Veränderung des primären Infarktvolumens ergab, mittels Berechnung des nichtinfarzierten Cortexvolumens bestätigt werden. Außerdem konnte in dieser Studie⁸⁹ eine gute Korrelation von mit TTC und dann im Anschluß mit HE angefärbten Infarktvolumina gezeigt werden, was sich in unseren Versuchen reproduzieren ließ.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Teil I: MTH vs. Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei und nach Induktion einer temporären Ischämie

Milde Hypothermie: Nachdem bereits früh das neuroprotektive Potential von Hypothermie entdeckt worden war und in den 50er Jahren vor allem auch die tiefe Hypothermie im Fokus der Forschung stand,^{123,124} wurden diese Versuche wegen erheblicher Nebenwirkungen nicht weiter verfolgt. In den 80er Jahren stellte man fest, dass bereits eine nur geringe Absenkung der Hirntemperatur neuroprotektiv wirksam ist,²³ so dass in der Folgezeit Untersuchungen zum Einsatz milder und moderater Hypothermie zunahmen. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die milde Hypothermie als „pre-treatment“ (also bei Applikation *vor* einem ischämischen Ereignis) bei temporärer Ischämie (1) sämtlichen zur Zeit in der Klinik verwendeten „Standard“ - Neuroprotektiva wie beispielsweise Mannitol, Dexamethason, Nimodipin oder den Barbituraten überlegen ist¹⁶² und (2) auch im Vergleich mit anderen von uns getesteten Monotherapien wie Magnesium und Tirilazad das wirksamste Einzeltherapeutikum ist.¹²⁸

MTH als „pre-treatment“: Nachdem in unserer Arbeitsgruppe die Kombination aus Magnesium und Tirilazad auf ihre neuroprotektive Wirksamkeit hin überprüft worden war, zeigte sich ein Synergismus hinsichtlich Infarktreduktion und funktioneller neurologischer Erholung der behandelten Tiere.¹³⁰ Außerdem ließ sich durch die Kombination der beiden Pharmaka mit milder Hypothermie die neuroprotektive Potenz von Hypothermie noch steigern.¹²⁸ MTH reduzierte das Gesamtinfarktvolumen um 77% im Vergleich zur Kontrollgruppe, am deutlichsten war der Effekt im Kortex ausgeprägt, wo der Infarkt um 99% reduziert worden war. Aber auch in den Basalganglien zeigte sich eine signifikante Reduktion um 55%. Passend zum Effekt der Therapie auf die Infarktentwicklung zeigte sich bei den mit MTH behandelten Tieren auch eine signifikant bessere neurologische Erholung.

MTH als „post-treatment“: Bei temporärer zerebraler Ischämie reduzierte MTH das Infarktvolumen und bewirkte eine bessere funktionelle Erholung der Versuchstiere. Dieser Effekt war bis zu einem Applikationszeitpunkt von 180 Minuten nach Ischämieinduktion signifikant. Im Vergleich mit anderen Studien⁹⁵ ließ sich das therapeutische Fenster einer Monotherapie mit milder Hypothermie durch die Kombination mit Magnesium und Tirilazad um eine Stunde erweitern.

Bei einer Monotherapie mit moderater Hypothermie von 30°C ist zwar ein ähnlich weites therapeutisches Fenster wie bei unseren Ergebnissen mit MTH beschrieben.¹⁶⁴ Klarer Nachteil einer therapeutischen Kühlung auf dieser Temperaturstufe ist allerdings die deutlich höhere Inzidenz von Nebenwirkungen.¹³²

Da alle Bestandteile von MTH klinisch zugelassen sind, erscheint diese Kombinationstherapie in der Zusammenschau der experimentellen Ergebnisse als hoffnungsvoller Kandidat für eine klinische Überprüfung.

Ein bedeutender Faktor bei der Entwicklung einer therapeutischen Strategie zur Verhütung eines fokalen ischämischen Hirnschadens ist das verfügbare therapeutische Fenster. Dieses ist nicht nur vor dem klinischen Hintergrund der Schlaganfallbehandlung, sondern auch bei neurochirurgischen Patienten zu berücksichtigen. So kann es intraoperativ für den Chirurgen zunächst unbemerkt zu einer Thrombose, Embolie, Dissektion oder einem Vasospasmus mit nachfolgender Stenose oder Verschluss eines hirnversorgenden Gefäßes kommen. Da es also noch während der Operation zur Induktion einer Ischämie kommen kann, können Stunden vergehen, ehe die Operation zu Ende ist und die klinischen Zeichen deutlich werden, oder, wie im Fall von dauerhaft bewusstlosen Patienten, bevor sich Zeichen der Ischämie durch bildgebende Verfahren darstellen lassen. Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die eine Anwendung von postischämischer Hypothermie mit einer Verzögerung der Therapie von bis zu 300 Minuten nach Induktion einer experimentellen Ischämie untersucht hat. Unsere Ergebnisse lassen sich nicht durch eine Verlängerung der Halothannarkose begründen, da die postischämische Applikation von Halothan nicht zu einer verbesserten Neuroprotektion führt.¹²⁷ Auch Unterschiede der physiologischen Parameter zwischen den Gruppen erklären die Ergebnisse

nicht. Weiterhin wurde durch konsequente Laser Doppler-gestützte Kontrolle eines adäquaten Verschlusses der A. cerebri media in allen Gruppen während des gesamten Experimentes eine Filamentdislokation mit intermittierender Reperfusion oder eine Gefäßperforation ausgeschlossen.¹²⁹

Unter diesem Gesichtspunkt scheinen daher eher pharmakologische Effekte für die beobachtete Erweiterung des therapeutischen Fensters milder Hypothermie verantwortlich zu sein. Bisher konnte man nur bis zu einer postischämischen Verzögerung der milden Hypothermie von 120 Minuten noch einen zerebroprotektiven Effekt nachweisen.^{70,95}

So war gezeigt worden, dass das therapeutische Fenster von Magnesium, appliziert in einem Rattenmodell, bei dem ein Verschluss der MCA mittels Embolisation eines autologen Thrombus erreicht wurde, 6 Stunden nach Initiation der Ischämie beträgt.¹⁵⁹ Bei globaler Ischämie konnte sogar ein neuroprotektiver Effekt auf die CA1 Region des Rattenhippocampus nachgewiesen werden, wenn Magnesium 24 Stunden nach Ischämie gegeben wurde.¹⁵⁴ Eine klinische Pilot-Schlaganfallstudie beschrieb nach Magnesiumgabe eine geringere Letalität und Pflegebedürftigkeit der Patienten,¹⁰⁷ während Daten aktueller Multizenterstudien noch ausstehen.^{20,105}

Obwohl die RANTTAS-Studie, bei der Tirilazad in einem Median von 4,3 Stunden nach Ischämie gegeben worden war, 1996 aufgrund einer Interimanalyse, die keinen nachweisbaren Effekt zeigte, beendet wurde,¹⁵³ gibt es experimentelle Daten, die ein therapeutisches Fenster von mindestens 3 Stunden nach Induktion einer temporären fokalen Ischämie vermuten lassen.¹⁹ Ein möglicher Grund für den fehlenden Effekt von Tirilazad bei klinischen Schlaganfallstudien könnte die Tatsache sein, dass über 75% der Patienten Tirilazad nach mehr als 3 Stunden bekommen hatten.¹ Nach SAB hingegen konnte ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden.^{61,62,81,87} Außerdem scheint die Wirksamkeit von Tirilazad bei temporärer Ischämie ausgeprägter zu sein als bei permanenter Ischämie,¹⁵⁸ was auch durch Untersuchungen gestützt wird, die zeigten, dass besonders viele freie Radikale in der ischämischen Penumbra und nach Reperfusion gebildet werden.^{101,139}

Bei Patienten mit embolischem Verschluss einer hirnversorgenden Arterie wird eine Lysetherapie mit tPA immer häufiger durchgeführt.⁵⁹ Christou und Mitarbeiter³¹ verabreichten einen tPA Bolus 132+/-54 Minuten nach Auftreten von Symptomen einer zerebralen Ischämie. Im Mittel 251+/-171 Minuten nach Beginn des Schlaganfalls konnte dopplersonographisch eine Rekanalisation nachgewiesen werden. Hier kam es bei 30% der Patienten zu einer vollständigen und bei 40% der Patienten zu einer partiellen Rekanalisation.

Es ist denkbar, dass eine milde Hypothermie das therapeutische Fenster nach fokaler zerebraler Ischämie erweitert und so einem Radikalfänger wie Tirilazad ermöglicht, noch mehrere Stunden nach kompletter oder partieller Reperfusion einen Effekt zu zeigen.

4.2.2 Teil IIA und IIB: MTH vs. Kontrolle vor permanenter Ischämie – chronische und akute Versuchsgruppen

MTH hemmt bei temporärer Ischämie sowohl bei Gabe vor als auch während und sogar bis zu mindestens 180 Minuten nach Beginn der Ischämie effektiv die Infarktentwicklung und verbessert die neurologische Erholung. In Teil II unserer Untersuchungen beschäftigten wir uns mit der Frage nach dem neuroprotektiven Potential der Kombinationstherapie bei permanenter Ischämie, da häufig klinische Situationen bestehen, in denen eine Neuroprotektion im Rahmen einer permanenten zerebralen Ischämie wünschenswert wäre.

Hierzu gehören Situationen, in denen keine Lysetherapie durchführbar ist oder sich trotz Lysetherapie ein verschlossenes Gefäß nicht wiedereröffnen lässt. Es resultiert eine permanente Gefäßokklusion.

Auch im Rahmen von neurochirurgischen Operationen kann es zu dauerhaften Gefäßverschlüssen kommen.

Betrachtet man zunächst die Einzelkomponenten von MTH, so gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Effektivität bei permanenter Ischämie:

(1) *Hypothermie*: Zahlreiche Autoren konnten bei prä- oder intranschämischer Applikation von systemischer milder oder moderater Hypothermie einen protektiven Effekt zeigen.^{48,94,117,157}

Morikawa et al.¹⁰² hingegen konnten nach einer Überlebenszeit von 3 Tagen keine neuroprotektive Wirkung der Hypothermie bei permanenter Mediaokklusion mehr nachweisen. Allerdings wurde durch die Temperaturveränderung das topographische Muster der kortikalen Infarzierung verändert. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Ridenour et al.,¹²² als sie bei Ihren Experimenten während der ersten beiden Stunden Ischämie eine milde Hypothermie von 33°C induzierten und nach 4 Tagen planimetrisch das Infarkt volumen bestimmten. Die behandelten Tiere zeigten weder ein besseres neurologisches Outcome noch eine Reduktion der Infarzierung.

Generell lässt sich bei permanenter Ischämie im Vergleich zur Anwendung bei temporärer Ischämie sagen, dass in Abhängigkeit von Dauer der Hypothermie, Zeitpunkt der Induktion und Grad der Abkühlung ein Effekt bei längeren Überlebenszeiten von einigen Tagen bis Wochen geringer ausgeprägt oder gar nicht mehr nachzuweisen ist.^{53,94} Doerfler et al.³⁸ zeigten in einer aktuellen Studie, dass eine signifikante Reduktion des Infarkt volumens durch milde Hypothermie nach 6 Stunden Ischämie schon nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Bei Kombination von Hypothermie mit einer dekompressiven Kraniotomie war der Effekt von Dauer und stärker ausgeprägt als bei alleiniger Kraniotomie. Diese Studie unterstützt damit erneut die Forderung nach einer Kombination der Hypothermie mit anderen zerebroprotektiven Maßnahmen.

(2) *Tirilazad und Magnesium*: Uneinigkeit besteht bei den Autoren auch hinsichtlich der Wirksamkeit von Tirilazad und Magnesium bei permanenter Ischämie. Während Yang et al.¹⁵⁹ bei Applikation von Magnesiumsulfat 6 Stunden nach permanenter Mediaokklusion noch einen positiven Effekt auf

Mortalität, neurologische Erholung und Infarktvolumen sahen, konnten Xue et al.¹⁵⁸ nur bei temporärer Ischämie eine Wirkung von Tirilazad nachweisen.

Vergleicht man die Ergebnisse von Teil IIA (chronische Versuchsgruppen) und IIB (akute Versuchsgruppen) der aktuellen Studie und setzt sie in Beziehung zu den Ergebnissen von Teil I (temporäre Ischämie), so lässt sich Folgendes feststellen:

(1) Nach 6 Stunden Ischämie zeigt sich eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens bei den mit MTH behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese neuroprotektive Wirkung auf die Infarktentwicklung lässt sich in den chronischen Versuchsgruppen nach 7 Tagen nicht mehr nachweisen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Infarktvolumina in Therapie- und Kontrollgruppe annähernd gleich.

(2) Betrachtet man nur die Kontrollgruppe, so fällt auf, dass der Infarkt während der postoperativen Beobachtungszeit (6 Stunden vs. 7 Tage) etwas kleiner geworden ist. Dies lässt sich mit der in den ersten 3 Tagen nach Ischämieinduktion ausgeprägten Ödembildung erklären.⁹²

Es scheint also nur der Infarkt in der Therapiegruppe gewachsen zu sein, ein Phänomen, das in der Literatur beschrieben ist³⁸ und sich beispielsweise durch eine vorübergehende Unterdrückung der Ödemkomponente durch die Hypothermie erklären ließe.

(3) Generell war das neurologische Outcome bei allen Tieren schlechter als in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe mit temporärer Ischämie, die Tiere der Kontrollgruppe erholten sich während der gesamten 7 postoperativen Tage nicht. Dies zeigt sich im Vergleich zum ersten Teil dieser Arbeit wie auch im Vergleich zu einer 1999 publizierten Studie¹²⁸ mit Gabe von MTH vor temporärer Ischämie. Zusammenfassend erholten sich hier die Tiere der Kontrollgruppe langsamer als in der therapierten Gruppe, trotzdem hatten am Ende der siebentägigen Untersuchungsperiode einige der Kontrolltiere und keines der mit MTH therapierten Tiere ein neurologisches Defizit mehr. Kawamura et al.⁸² zeigten in direktem Vergleich, wie sich Tiere mit einer permanenten Ischämie bei größerem Infarkt und schlechterer Gewichtsentwicklung auch neurologisch schlechter erholten als Tiere mit temporärer Ischämie.

(4) In den Versuchen mit permanenter Ischämie zeigen sich also im Vergleich zur temporären Ischämie bei keinem dauerhaften Effekt der Kombinationstherapie auf die Infarktbildung größere Infarkte, ein schlechteres neurologisches Outcome und eine schlechtere Gewichtsentwicklung. Man sieht allerdings eine in Diskrepanz zur Infarktbildung stehende relativ bessere Erholung der therapierten Tiere. Hierfür wären mehrere Erklärungen denkbar: Eine Verbesserung der neurologischen Funktion nach Ischämie kann durch eine graduelle Abnahme des Hirnödems und Verkleinerung der Läsion bedingt sein.¹⁶¹ Aber auch andere Kompensationsmöglichkeiten im Sinne der neuronalen Plastizität werden diskutiert.^{33,145,156} Hierbei können gestörte Hirnfunktionen durch andere Areale übernommen werden. Ni et al.¹⁰⁹ konnten nach permanenter MCA-Okklusion eine Atrophie der ipsilateralen Substantia nigra reticulata (SNR) nachweisen, die sich einhergehend mit einer besseren neurologischen Erholung der behandelten Tiere nach Applikation eines AMPA-Antagonisten zurückbildete. Bemerkenswerterweise waren von diesem Effekt die primären kortikalen und subkortikalen Infarkte unbeeinflusst. Andere Arbeiten konnten sowohl durch NMDA-Antagonismus¹⁴⁵ als auch durch milde Hypothermie⁷⁵ direkte pathophysiologische Zusammenhänge zu einer besseren funktionellen Erholung herstellen.

5 Zusammenfassung

Nach wie vor sind die therapeutischen Möglichkeiten bei einem ischämischen Schlaganfall noch nicht ausgeschöpft. Viele potentiell neuroprotektive Substanzen zeigten sich im Tierexperiment als außerordentlich wirksam, in der Klinik waren jedoch nur geringe Erfolge zu verbuchen. Mit zunehmendem Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge bei der zerebralen Ischämie ergaben sich neue therapeutische Ansätze. Trotzdem wurde schnell deutlich, dass auch pathophysiologisch orientierte Monotherapien oft nicht den gewünschten Effekt zeigten. Ein möglicherweise weiterführendes Konzept besteht darin, verschiedene therapeutische Ansätze zu kombinieren und auf Synergismen hin zu untersuchen. So wurde in unserer Arbeitsgruppe der „Münchner Cocktail“ MTH, bestehend aus Magnesium, Tirilazad und milder Hypothermie, entwickelt. Die Kombination erwies sich im Tierexperiment bei Gabe vor einer temporären fokalen Ischämie als außerordentlich wirksam und zeigte hinsichtlich neurologischer Erholung, Gewichtsentwicklung und Reduktion des Infarkt Volumens wesentlich bessere Effekte als die neurochirurgische Standardtherapie.

Diese Ergebnisse lieferten die experimentelle Grundlage für eine klinische Studie, die im Juli 2000 in der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern begonnen wurde und das Outcome bei perioperativer Therapie mit Magnesium, Tirilazad und moderater Hypothermie mit der bisher üblichen neuroprotektiven Therapie aus Barbiturat, Nimodipin und Dexamethason bei inzidentellen Aneurysmen zerebraler Gefäße vergleicht.

Ziel des aktuellen Projektes war es, den bei einer neurochirurgisch orientierten Fragestellung („pre-treatment“ vor temporärer Ischämie) so erfolgreichen Cocktail auch auf seine Wirksamkeit bei einem ischämischen Schlaganfall („post-treatment“ bei temporärer bzw. permanenter Ischämie) hin zu untersuchen. Als experimentelles Modell für die Versuche zur temporären und permanenten Ischämie verwendeten wir das Intraluminale Fadenmodell nach Koizumi et al.,⁸⁵ bei dem mittels eines über die A. carotis interna vorgeschobenen Fadens der Abgang der A. cerebri media verschlossen und

dadurch eine fokale Ischämie induziert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

(1) Das neuroprotektive Potential von MTH bei temporärer Ischämie konnte in Fortsetzung der positiven Ergebnisse früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nun auch bei Gabe während und nach einer Ischämie bestätigt werden. Unseres Wissens ist dies die erste Studie, die eine Anwendung von postischämischer Hypothermie mit einer Verzögerung der Therapie bis zu 300 Minuten nach Induktion einer experimentellen Ischämie untersucht hat. Bis zu 180 Minuten nach Induktion ließ sich die Infarktgröße bei den therapierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzieren. Am ausgeprägtesten war die Wirkung auf den kortikalen Infarkt. Der Effekt auf die neurologische Erholung war an den ersten beiden postoperativen Tagen in den Gruppen mit Gabe des Cocktails bis einschließlich 180 Minuten nach Einleitung der Ischämie signifikant. Der kombinierte Therapieansatz scheint also auch für die in der klinischen Realität häufig verzögerte Behandlung eines Schlaganfalles geeignet zu sein.

(2) MTH erwies sich bei permanenter Ischämie im Vergleich zu den Versuchen mit temporärer Ischämie als weniger wirksam. Ein signifikanter Effekt auf die Infarktentwicklung war nach 6 Stunden permanenter Ischämie zu beobachten. Allerdings ließ sich diese Wirkung nach 7 postoperativen Tagen nicht mehr nachweisen, was wir anhand einer zweiten Versuchsreihe zeigen konnten, bei der wir die eigenen Ergebnisse überprüften. Trotzdem zeigten die behandelten Tiere im 7-tägigen Beobachtungszeitraum eine bessere neurologische Erholung (signifikant an Tag 6 und 7) und Gewichtsentwicklung (signifikant an Tag 7). Zusammenfassend haben wir unsere eigenen Ergebnisse prospektiv und randomisiert im Tierexperiment überprüft. Wir konnten in sämtlichen durchgeführten Versuchsreihen das neuroprotektive Potential des neu entwickelten kombinierten Therapiekonzeptes „Münchener Cocktail“ bestätigen. So stellt MTH unseres Erachtens auch einen hoffnungsvollen Ansatz zur Therapie von Patienten mit anhaltendem Verschluss einer hirnversorgenden Arterie dar. Dies lässt sich vor allem durch die positive Beeinflussung des in der Klinik bedeutendsten Outcomeparameters, der funktionellen neurologischen Erholung, begründen.

6 Literaturverzeichnis

1. Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: A systematic review. Tirilazad International Steering Committee. *Stroke*. 2000;31:2257-2265.
2. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N.Engl.J.Med.* 2002;346:549-556.
3. Abe K, Yuki S, Kogure K. Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke*. 1988;19:480-485.
4. Akins PT, Hsu CY. Future directions in research and development of new treatments for ischemic stroke, in Hsu CY (ed): Ischemic stroke: From basic mechanisms to new drug development. *Monogr Clin Neurosci*. Vol 16. Basel: Karger, 1998;pp 151-162.
5. Andrews RJ. Neuroprotection in surgery. Development of a pharmacologic cocktail for intraoperative use. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1997;825:288-304.
6. Arias RL, Tasse JR, Bowlby MR. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an in vitro model of cerebral ischemia. *Brain Res*. 1999;816:299-308.
7. Aronowski J, Cho KH, Strong R, Grotta JC. Neurofilament proteolysis after focal ischemia; when do cells die after experimental stroke? *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 1999;19:652-660.
8. Aspey BS, Alp MS, Patel Y, Harrison MJ. Effects of combined glutamate and platelet-activating factor inhibition on the outcome of focal cerebral ischaemia - an initial screening study. *Metab.Brain Dis*. 1997;12:237-249.

9. Astrup J. Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. *J.Neurosurg.* 1982;56:482-497.
10. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981;12:723-725.
11. Baethmann A. Das ischämische Hirnödem, in Grossmann W, Paal G (eds): Schlaganfall. Pathologie und Therapie des ischämischen Infarkts. Stuttgart - New York: Schattauer, 1987.
12. Baethmann A, Schürer L, Unterberg A, Wahl W, Staub F, Kempfski O. Mediator substances of brain edema in cerebral ischemia. *Arzneimittelforschung.* 1991;41:310-315.
13. Barone FC, Feuerstein GZ, White RF. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1997;21:31-44.
14. Beckman JS, Ye YZ, Chen J, Conger KA. The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic injury. *Adv.Neurol.* 1996;71:339-350.
15. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke.* 1995;26:1086-1091.
16. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 1986;17:472-476.
17. Bigge CF, Boxer PA. Neuronal cell death and strategies for neuroprotection, in Bristol JA (ed): Annual reports in medicinal chemistry. San Diego: Academic Press, Inc., 1994;pp 13-22.

18. Bogousslavsky J, Dekeyser J, Diener HC, Fieschi C, Hacke W, Kaste M, Orgogozo JM, Pulsinelli W, Wahlgren NG. Neuroprotection as initial therapy in acute stroke - third report of an ad hoc consensus group meeting. *Cerebrovasc.Dis.* 1998;8:59-72.
19. Boisvert DP, Hall ED. Tirilazad prevention of reperfusion edema after focal ischemia in cynomolgus monkeys. *Can.J.Neurol.Sci.* 1996;23:46-52.
20. Bradford A, Lees K. Design of the Intravenous Magnesium Efficacy in Acute Stroke (IMAGES) trial. *Curr Control Trials Cardiovasc med.* 2000;1:184-190.
21. Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res.* 1997;778:16-24.
22. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci.Lett.* 1989;101:299-304.
23. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1987;7:729-738.
24. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke.* 1989;20:904-910.
25. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996;27:1124-1129.
26. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 1988;11:465-469.

27. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988;1:623-634.
28. Choi DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J.Neurosci*. 1990;10:2493-2501.
29. Choi DW, Lobner D, Dugan LL. Glutamate receptor-mediated neuronal death in the ischemic brain, in Hsu CY (ed): Ischemic stroke: From basic mechanisms to new drug development. *Monogr.Clin.Neurosci*. Vol 16. Basel: Karger, 1998;pp 2-13.
30. Chopp M, Frinak S, Walton DR, Smith MB, Welch KM. Intracellular acidosis during and after cerebral ischemia: in vivo nuclear magnetic resonance study of hyperglycemia in cats. *Stroke*. 1987;18:919-923.
31. Christou I, Alexandrov AV, Burgin WS, Wojner AW, Felberg RA, Malkoff M, Grotta JC. Timing of recanalization after tissue plasminogen activator therapy determined by transcranial doppler correlates with clinical recovery from ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:1812-1816.
32. Clifton GL, Allen S, Barrodale P, Plenger P, Berry J, Koch S, Fletcher J, Hayes RL, Choi SC. A phase-II study of moderate hypothermia in severe brain injury. *J.Neurotrauma*. 1993;10:263-271.
33. Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog.Neurobiol*. 1998;54:531-548.
34. De-Keyser J, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci*. 1999;22:535-540.
35. Dietrich WD, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD. Brain damage and temperature: cellular and molecular mechanisms. *Adv.Neurol*. 1996;71:177-194.

36. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1989;9:589-596.
37. Dirnagl U, Meisel A. Zerebrale Ischämie, in Ganten D, Ruckpaul K (eds): *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5, Erkrankungen des Zentralnervensystems.* Berlin: Springer-Verlag, 1999;pp 510-541.
38. Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M. Combination of decompressive craniectomy and mild hypothermia ameliorates infarction volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke.* 2001;32:2675-2681.
39. Dubinsky JM. Examination of the role of calcium in neuronal death. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993;679:34-42.
40. Ebel H, Gunther T. Magnesium metabolism: a review. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1980;18:257-270.
41. Eyre JA, Essex TJ, Flecknell PA, Bartholomew PH, Sinclair JI. A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres. *Clin.Phys.Physiol.Meas.* 1988;9:65-74.
42. Farooqui AA, Horrocks LA. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 1991;16:171-191.
43. Fay T. Observations on generalized refrigeration in cases of severe cerebral trauma. *Assoc.Res.Nerv.Ment.Dis.Proc.* 1943;24:611-619.
44. Fisher M. Potentially effective therapies for acute ischemic stroke. *Eur.Neurol.* 1995;35:3-7.
45. Fisher M, Bogousslavsky J. Further evolution toward effective therapy for acute ischemic stroke. *JAMA.* 1998;279:1298-1303.

46. Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol.Chem.Neuropathol.* 1990;12:55-70.
47. Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J, Takaku A. The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery.* 1995;36:358-364.
48. Galante A, Silvestrini M, Stanzione P, Pietroiusti A, Baldoni F, Domenici B, Bernardi G. Leucocyte aggregation in acute cerebrovascular disease. *Acta Neurol.Scand.* 1992;86:446-449.
49. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian JY. Brain microvessels: Factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am.J.Pathol.* 1994;145:728-740.
50. Ghribi O, Callebert J, Verrecchia C, Plotkine M, Boulu RG. Blockers of NMDA-operated channels decrease glutamate and aspartate extracellular accumulation in striatum during forebrain ischaemia in rats. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1995;9:141-146.
51. Ginsberg MD. Neuroprotection in brain ischemia: an update (Part I). *Neuroscientist.* 1995a;1:95-103.
52. Ginsberg MD. Neuroprotection in brain ischemia: an update (Part II). *Neuroscientist.* 1995b;1:164-175.
53. Ginsberg MD. Temperature influences on ischemic brain injury, in Hsu CY (ed): Ischemic stroke: From basic mechanisms to new drug development. *Monogr Clin Neurosci.* Vol 16. Basel: Karger, 1998;pp 65-88.
54. Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MYT, Dietrich WD, Busto R. Therapeutic modulation of brain temperature - relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 1992;4:189-225.

55. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J.Neurochem.* 1988;51:1455-1464.
56. Goracci G. PAF in the nervous system: biochemistry and pathophysiology, in Krieglstein J, Oberpichler H (eds): *Pharmacology of cerebral ischemia 1990*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1990;pp 377-390.
57. Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. *Am.J.Physiol.* 1989b;256:H1255-1260.
58. Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. *Am.J.Physiol.* 1989a;256:H1247-1254.
59. Hacke W, Brott T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von-Kummer R, Donnan G, Heiss WD, Wahlgren NG, Spranger M, Boysen G, Marler JR. Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology.* 1999;53:S3-14.
60. Hakim AM. Ischemic penumbra: The therapeutic window. *Neurology.* 1998;51:S44-46.
61. Haley EC, Kassell NF, Alves WM, Weir BKA, Hansen CA. Phase II trial of tirilazad in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A report of the cooperative aneurysm study. *J.Neurosurg.* 1995;82:786-790.
62. Haley EC, Jr., Kassell NF, Apperson-Hansen C, Maile MH, Alves WM. A randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A cooperative study in North America. *J.Neurosurg.* 1997;86:467-474.
63. Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann.Emerg.Med.* 1993;22:1022-1027.

64. Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *J.Neurol.Sci.* 1995;134 (Suppl.):79-83.
65. Hall ED. Lipid peroxidation. *Adv.Neurol.* 1996;71:247-257.
66. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J.Neurochem.* 1992;59:1609-1623.
67. Heiss WD, Graf R, Wienhard K, Lottgen J, Saito R, Fujita T, Rosner G, Wagner R. Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1994;14:892-902.
68. Hoff JT. Cerebral protection. *J.Neurosurg.* 1986;65:579-591.
69. Huang KP. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci.* 1989;12:425-432.
70. Huh PW, Belayev L, Zhao W, Koch S, Busto R, Ginsberg MD. Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intraischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. *J.Neurosurg.* 2000;92:91-99.
71. Hungerhuber E, Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Baethmann A, Reulen HJ. Mild hypothermia plus combination pharmacotherapy enhances neuroprotection against temporary MCA occlusion in rats. *Cerebrovasc.Dis.* 1998;8 (Suppl. 4):15 (Abstract)
72. Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R. Combination therapy: A promising treatment strategy for cerebral ischemia, in Ito U, Fieschi C, Orzi F, et al (eds): Maturation phenomenon in cerebral ischemia III. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999;pp 159-167.
73. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997;20:132-139.

74. Illievich UM, Zornow MH, Choi KT, Strnat MAP, Scheller MS. Effects of hypothermia or anesthetics on hippocampal glutamate and glycine concentrations after repeated transient global cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 1994;80:177-186.
75. Itoh Y. Effects of mild and moderate hypothermia on cerebral function and cerebral circulation of the rat in vivo. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 1999;74:405-414.
76. Izumi Y, Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 1991;11:1025-1030.
77. Kader A, Brisman MH, Maraire N, Huh JT, Solomon RA. The effect of mild hypothermia on permanent focal ischemia in the rat. *Neurosurgery*. 1992;31:1056-1061.
78. Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1994;35:272-277.
79. Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang XJ, Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1991;22:1032-1039.
80. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood- brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 1994;14:620-627.

81. Kassell NF, Haley EC, Apperson-Hansen C, Stat M, Alves WM, Dorsch NW, Fabinyi G, Matheson J, Reilly P, Siu K, Stokes B, Stuart G, Koos W, Calliauw L, Selosse P, Astrup J, Gjerris F, Mendelow AD, Castel JP, Christiaens JL, Cophignon J, Keravel Y, Lagarrigue J, Mourier K, Philippon J, Brandt L, Vonessen C, Persson L, Brock M, Fahlbusch P, Gilsbach J, Hassler W, Perneczky A, Samii M, Schmiedek P, Mee E, Arista A, Cantore G, Carteri A, Collice M, Dapian R, Marini G, Menonna P, Baena RRY, Matteo PS, Testa PC, Villani R, Antunes JL. Randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A cooperative study in Europe, Australia, and New Zealand. *J.Neurosurg.* 1996;84:221-228.
82. Kawamura S, Li YP, Shirasawa M, Yasui N, Fukasawa H. Reversible middle cerebral artery occlusion in rats using an intraluminal thread technique. *Surg.Neurol.* 1994;41:368-373.
83. Kempfski O, Heimann A, Nakase H. Biochemische Hirnprotektion. *Anaesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 1997;32 (Suppl.):S286-290.
84. Kempfski OS. Neuroprotection - models and basic principles. *Anaesthesist.* 1994;43 (Suppl.):S25-33.
85. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn.J.Stroke.* 1986;8:1-8.
86. Lanier WL. Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J.Neurosurg.Anesthesiol.* 1995;7:216-221.

87. Lanzino G, Kassell NF, Dorsch NW, Pasqualin A, Brandt L, Schmiedek P, Truskowski LL, Alves WM. Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in women with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part I. A cooperative study in Europe, Australia, New Zealand, and South Africa. *J.Neurosurg.* 1999;90:1011-1017.
88. Lawton MT, Raudzens PA, Zabramski JM, Spetzler RF. Hypothermic circulatory arrest in neurovascular surgery: evolving indications and predictors of patient outcome. *Neurosurgery.* 1998;43:10-20.
89. Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke.* 1993;24:117-121.
90. Lindsberg PJ, Tian-Li Y, Frerichs KU, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Evidence for platelet-activating factor as a novel mediator in experimental stroke in rabbits. *Stroke.* 1990;21:1452-1457.
91. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91.
92. Loubinoux I, Volk A, Borredon J, Guirimand S, Tiffon B, Seylaz J, Méric P. Spreading of vasogenic edema and cytotoxic edema assessed by quantitative diffusion and T2 magnetic resonance imaging. *Stroke.* 1997;28:419-427.
93. Müller TB, Haraldseth O, Unsgard G. Characterization of the microcirculation during ischemia and reperfusion in the penumbra of a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion: A laser doppler flowmetry study. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 1994;14:289-295.
94. Maher J, Hachinski V. Hypothermia as a potential treatment for cerebral ischemia. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 1993;5:277-300.

95. Maier CM, Sun GH, Kunis D, Yenari MA, Steinberg GK. Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. *J.Neurosurg.* 2001;94:90-96.
96. Marinov MB, Harbaugh KS, Hoopes PJ, Pikus HJ, Harbaugh RE. Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. *J.Neurosurg.* 1996;85:117-124.
97. Melloni E, Pontremoli S. The calpains. *Trends Neurosci.* 1989;12:438-444.
98. Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Penumbral tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 1992;23:552-559.
99. Michenfelder JD, Theye RA. The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation. *Anesthesiology.* 1970;33:430-439.
100. Miyazawa T, Hossmann KA. Methodological requirements for accurate measurements of brain and body temperature during global forebrain ischemia of rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1992;12:817-822.
101. Moore LE, Traystman RJ. Role of oxygen free radicals and lipid peroxidation in cerebral reperfusion injury. *Adv.Pharmacol.* 1994;31:565-576.
102. Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY, Busto R. The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia - histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1992;12:380-389.
103. Moskowitz MA, Dalkara T. Nitric oxide and cerebral ischemia. *Adv.Neurol.* 1996;71:365-367.

104. Moyer DJ, Welsh FA, Zager EL. Spontaneous cerebral hypothermia diminishes focal infarction in rat brain. *Stroke*. 1992;23:1812-1816.
105. Muir KW. New experimental and clinical data on the efficacy of pharmacological magnesium infusions in cerebral infarcts. *Magnes.Res*. 1998;11:43-56.
106. Muir KW. New experimental and clinical data on the efficacy of pharmacological magnesium infusions in cerebral infarcts. *Magnes.Res*. 1998;11:43-56.
107. Muir KW, Lees KR. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of intravenous magnesium sulfate in acute stroke. *Stroke*. 1995;26:1183-1188.
108. Nakai H, Yamamoto YL, Diksic M, Worsley KJ, Takara E. Triple-tracer autoradiography demonstrates effects of hyperglycemia on cerebral blood flow, pH, and glucose utilization in cerebral ischemia of rats. *Stroke*. 1988;19:764-772.
109. Ni JW, Takahashi M, Yatsugi S, Shimizu-Sasamata M, Yamaguchi T. Effects of YM872 on atrophy of substantia nigra reticulata after focal ischemia in rats. *Neuroreport*. 1998;9:3719-3724.
110. Oertel WH. Zerebrale Ischämie, in Siegenthaler W (ed): *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag, 1994;pp 880-888.
111. Okawa M. Effects of magnesium sulfate on brain damage by complete global brain ischemia. *Masui*. 1992;41:341-355.
112. Olney JW. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969;164:719-721.
113. Olney JW. Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: An overview. *Psychopharmacol.Bull*. 1994;30:533-540.

114. Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*. 1991;254:1515-1518.
115. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*. 1987;50:402-410.
116. Park CK, Hall ED. Dose-response analysis of the effect of 21-aminosteroid tirilazad mesylate (U-74006F) upon neurological outcome and ischemic brain damage in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 1994;645:157-163.
117. Park CK, Jun SS, Kim MC, Kang JK. Effects of systemic hypothermia and selective brain cooling on ischemic brain damage and swelling. *Acta Neurochir.Suppl.Wien*. 1998;71:225-228.
118. Peruche B, Krieglstein J. Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia - an overview. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiat*. 1993;17:21-70.
119. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 1998;18:196-205.
120. Pluta R, Lossinsky AS, Mossakowski MJ, Faso L, Wisniewski HM. Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology. *Acta Neuropathol*. 1991;83:1-11.
121. Pulsinelli WA. The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr.Opin.Neurol*. 1995;8:3-5.

122. Ridenour TR, Warner DS, Todd MM, Mcallister AC. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats. *Stroke*. 1992;23:733-738.
123. Rosomoff HL. Hypothermia and cerebral vascular lesions. II. Experimental middle cerebral artery interruption followed by induction of hypothermia. *Arch.Neurol.Psychiatry*. 1957;78:454-464.
124. Rosomoff HL, Holaday DA. Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am.J.Physiol*. 1954;179:85-88.
125. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann.Neurol*. 1986;19:105-111.
126. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor - Still lethal after eight years. *Trends Neurosci*. 1995;18:57-58.
127. Sarraf-Yazdi S, Sheng H, Brinkhous AD, Pearlstein RD, Warner DS. Effects of postischemic halothane administration on outcome from transient focal cerebral ischemia in the rat. *J.Neurosurg.Anesthesiol*. 1999;11:31-36.
128. Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A, Reulen HJ. Combination drug therapy and mild hypothermia: A promising treatment strategy for reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1999;30:1891-1899.
129. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage by laser Doppler flowmetry. *Stroke*. 1998;29:2162-2170.
130. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. Neuroprotective effects of combination therapy with tirilazad and magnesium in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1999;44:163-172.

131. Schmitt HJ, Barth GR, Thierauf P. Neuronal protection by intraischemic brain perfusion - an electron microscopy study in the rat. *J.Neurosurg.Anesthesiol.* 1994;6:265-274.
132. Schubert A. Side effects of mild hypothermia. *J.Neurosurg.Anesthesiol.* 1995;7:139-147.
133. Schuier FJ, Hossmann KA. Experimental brain infarcts in cats. II. Ischemic brain edema. *Stroke.* 1980;11:593-601.
134. Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Oda J, Tanaka H, Hiraide A, Shimazu T. Selection of severely head injured patients for mild hypothermia therapy. *J.Neurosurg.* 1998;89:206-211.
135. Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, Sugimoto T. Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *J.Neurosurg.* 1993;79:363-368.
136. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J.Neurosurg.* 1992a;77:169-184.
137. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J.Neurosurg.* 1992b;77:337-354.
138. Siesjö BK, Agardh CD, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc.Brain Metab.Rev.* 1989;1:165-211.
139. Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J.Neurotrauma.* 1995;12:943-956.
140. Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML. Neurocytotoxicity - Pharmacological Implications. *Fundam.Clin.Pharmacol.* 1991;5:755-767.
141. Siesjö BK, Siesjö P. Mechanisms of secondary brain injury. *Eur.J.Anaesthesiol.* 1996;13:247-268.

142. Slivka A, Murphy E, Horrocks L. Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1995;26:1061-1065.
143. Smith LW, Fay T. Temperature factors in cancer and embryonal cell growth. *JAMA*. 1939;113:653-660.
144. Solomon RA, Smith CR, Raps EC, Young WL, Stone JG, Fink ME. Deep hypothermic circulatory arrest for the management of complex anterior and posterior circulation aneurysms. *Neurosurgery*. 1991;29:732-737.
145. Sopala M, Frankiewicz T, Parsons C, Danysz W. Middle cerebral artery occlusion produces secondary, remote impairment in hippocampal plasticity of rats-involvement of N-methyl-D-aspartate receptors? *Neurosci.Lett*. 2000;281:143-146.
146. Spetzler RF, Hadley MN, Rigamonti D, Carter LP, Raudzens PA, Shedd SA, Wilkinson E. Aneurysms of the basilar artery treated with circulatory arrest, hypothermia, and barbiturate cerebral protection. *J.Neurosurg*. 1988;68:868-879.
147. Spinnewyn B, Cornet S, Auguet M, Chabrier PE. Synergistic protective effects of antioxidant and nitric oxide synthase inhibitor in transient focal ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab*. 1999;19:139-143.
148. Stuiver BT, Douma BRK, Bakker R, Nyakas C, Luiten PGM. In vivo protection against NMDA-induced neurodegeneration by MK-801 and nimodipine: Combined therapy and temporal course of protection. *Neurodegeneration*. 1996;5:153-159.
149. Symon L, Branston NM, Strong AJ, Hope TD. The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. *J.Clin.Pathol.Suppl.R.Coll.Pathol*. 1977;11:149-154.
150. Symon L, Lassen NA, Astrup J, Branston NM. Thresholds of ischaemia in brain cortex. *Adv.Exp.Med.Biol*. 1977;94:775-782.

151. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale G. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1981a;1:53-60.
152. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale G. Focal cerebral ischaemia in the Rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C]Iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1981b;1:61-69.
153. The RANTTAS Investigators. A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). *Stroke.* 1996;27:1453-1458.
154. Tsuda T, Kogure K, Nishioka K, Watanabe T. Mg²⁺ administered up to twenty-four hours following reperfusion prevents ischemic damage of the Ca1 neurons in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 1991;44:335-341.
155. Werner C. [Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma. Pathophysiologic principles] Milde und moderate Hypothermie als neues Therapiekonzept in der Behandlung der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn-Traumas. Pathophysiologische Grundlagen. *Anaesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 1997;32:210-218.
156. Witte OW, Bidmon H, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 2000;20:1149-1165.
157. Xue D, Huang ZG, Smith KE, Buchan AM. Immediate or delayed mild hypothermia prevents focal cerebral infarction. *Brain Res.* 1992;587:66-72.
158. Xue D, Slivka A, Buchan AM. Tirilazad reduces cortical infarction after transient but not permanent focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1992;23:894-899.

159. Yang Y, Li Q, Ahmad F, Shuaib A. Survival and histological evaluation of therapeutic window of post-ischemia treatment with magnesium sulfate in embolic stroke model of rat. *Neurosci.Lett.* 2000;285:119-122.
160. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 2002;9:112-121.
161. Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: A comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res.* 2000;863:94-105.
162. Zausinger S, Westermaier T, Baethmann A, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R. Neuroprotective treatment paradigms in neurovascular surgery - efficacy in a rat model of focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir.Suppl.* 2001;77:259-265.
163. Zausinger S, Westermaier T, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R. Combination drug therapy and mild hypothermia: A comparison with standard regimen in a rat model of reversible focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 1999;19 (Suppl. 1):S205 (Abstract)
164. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH, Zhang ZG. Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1993;24:1235-1240.

7 Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei Herrn PD Dr. Robert Schmid-Elsaesser für die Überlassung der Doktorarbeit und bei Ihm wie auch bei Herrn Dr. Stefan Zausinger für die exzellente Betreuung. Beide waren während Hoch- und Tiefphasen trotz eines übervollen Terminkalenders jederzeit für mich erreichbar. Bei Herrn Thomas Westermaier möchte ich mich sowohl für die Einführung in die Geheimnisse der Rattenchirurgie als auch für seine Unterstützung während der Durchführung der Arbeit bedanken. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Veronika Bischoff, die sich als MTA unserer Arbeitsgruppe weit über das übliche Maß hinaus für das Projekt engagierte und besonders auch für die Etablierung der TTC-Versuche einen entscheidenden Beitrag leistete.

Herrn Prof. Dr. A. Baethmann gilt mein Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe für „Experimentelle Neurochirurgie“ am Institut für Chirurgische Forschung der LMU. Hier wurden die Experimente durchgeführt und die Daten erhoben. Während meiner Zeit am ICF konnte ich nicht nur in einer äußerst professionellen Arbeitsumgebung lernen, was wissenschaftliches Arbeiten überhaupt bedeutet, auch die freundschaftliche Atmosphäre und der Teamgeist der Arbeitsgruppe trugen zur Motivation und Arbeitsfreude bei.

Stellvertretend gilt dieser Dank natürlich den Mitgliedern des „Neuroteams“. Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Messmer möchte ich mich für die Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung bedanken.

Ohne die Unterstützung meines Vaters, Herrn Kurt Schöller, wäre eine Hochschulausbildung und damit auch eine Dissertation in dieser Form sicher nicht möglich gewesen. Ihm und natürlich auch meiner Freundin Diana Ruß, die viel Verständnis für ein aufwendiges Studium und eine ebenso aufwendige Doktorarbeit zeigte und mich trotzdem dabei bestmöglich unterstützte, gilt mein liebster und persönlichster Dank.

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner 1992 verstorbenen Mutter Ingrid Schöller.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Schöller
 Vorname: Karsten
 Adresse: Kohlstraße 2, 80469 München
 Geburtsdatum/-ort: 28.5.1974, Crailsheim

Schulbildung:

1984-1993 Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim,
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst:

1993 - 1995 Krankenpflegetätigkeit: Abteilung für Innere Medizin,
 Kreiskrankenhaus Crailsheim

Hochschulbildung:

1995 – 1998 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 1998 – 2001 Technische Universität München
 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 seit 2001 Ludwig-Maximilians-Universität München
 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 Abschluss Fernstudium „BWL für Ärztinnen und
 Ärzte“ als Dipl. Gesundheitsökonom (Oec. med.)

Berufliche Tätigkeit:

seit 07/2002 Arzt im Praktikum, Neurochirurgische
 Universitätsklinik München-Großhadern