

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Ludwig- Maximilians Universität
München

Ehemaliger komm. Direktor Prof. Dr. med. A. Baethmann
Komm. Direktor Prof. Dr. U. Pohl

Die therapeutische Wirkung eines neuen Bradykinin B2- Rezeptorantagonisten
- LF 160687 MS -
auf das vasogene Hirnödem

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

vorgelegt von
Joachim Alexander Schulz
aus
München
2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Baethmann

Mitberichterstatter Prof. Dr. Ch. P. Sommerhoff
Prof. Dr. B. Fichtl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. med. N. Plesnila

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2005

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	4
A. Inzidenz und Mortalität des Schädel- Hirntraumas	4
B. Der sekundäre Hirnschaden	5
C. Das Hirnödem	8
D. Das Kallikrein- Kininsystem	9
1. Kininsynthese und Abbau	9
2. Kininrezeptoren	12
3. Bradykinin im Gehirn	14
E. Ziel der Arbeit	14
II. Material und Methoden	16
A. Versuchstiere	16
B. Versuchsablauf	16
1. Narkose	16
2. Präparation	16
3. Fokale Kälteläsion	17
4. Posttraumatische Phase	20
5. Entnahme des Gehirns – Trennung der Hirnhemisphären	20
6. Ermittlung des hemisphärischen Wassergehaltes	21
C. Versuchsgruppen	24
1. Vor- und Nachbehandlung mit LF 160687MS	24
2. .Nachbehandlung mit LF 160687MS	26

D. Untersuchungsmethoden	28
1. Ermittlung des Hemisphärgewichtes	28
2. Wassergehalt von Hirngewebe und Plasma	28
3. Hemisphärenschwellung: Berechnung nach Trauma	29
4. Korrigierte Schwellung - Berechnung	31
5. Korrigierte Schwellung - Verringerung des Trennfehlers	31
6. Systemischer Blutdruck	36
7. Körpertemperatur	36
8. Blutgase und Hämatokrit	36
9. Plasmakonzentration von LF 160687MS	37
10. Statistische Auswertung	37
11. Ausschlusskriterien	37
III. Ergebnisse	39
A. Auswirkung des Versuchs auf das Versuchstier	39
B. Vor- und Nachbehandlung mit LF 160687MS	39
1. Systemische Kontrollparameter	43
2. Serumkonzentration von LF 160687MS	47
3. Schlussfolgerung	47
C. Nachbehandlung mit LF 160687MS	49
Systemische Kontrollparameter	49
IV Diskussion	55
A. Wahl der Versuchstiere	55
B. Fokale Kälteläsion des Gehirns	56

C. Alternative Modelle	58
1. Mechanische Traumen	59
2. Thermische Traumen	60
D. Bradykinin	61
1. Bradykininwirkung	61
a. Peripherie	61
b. ZNS	62
2. Bradykininrezeptoren im Gehirn	65
3. Mediatorfunktion von Bradykinin beim traumatischen Hirnschaden	66
4. Rolle von Bradykinin bei der Entstehung des Hirnödems:	67
5. Bedeutung von Bradykinin Rezeptorantagonisten beim traumatischen Hirnschaden	69
E. Die Rolle von LF 160687MS	70
1. Pharmakologie	70
2. Versuche in vitro und an isolierten Organen	72
3. In Vivo Experimente	72
F. Therapeutische Wirksamkeit der selektiven Bradykin B2- Rezeptorblockade durch LF 160687MS beim vasogenen Hirnödem	73
V. Zusammenfassung	77
VI. Literaturverzeichnis	79
Danksagung	100
Lebenslauf	102

I. Einleitung

A. Inzidenz und Mortalität des Schädel- Hirntraumas

Schädel- Hirnverletzungen spielen in der Unfallchirurgie eine enorm wichtige Rolle. Trotz erhöhter Sicherheitsstandards und besserer Prävention im Strassenverkehr, bei Sport und am Arbeitsplatz werden allein in Deutschland pro Jahr ca. 280 000 Patienten mit der Diagnose Schädel- Hirntrauma in die Klinik eingewiesen (Stat. Bundesamt 1993-95). Der Schweregrad reicht von einer leichten Gehirnerschütterung bis hin zu schwersten Schädel- Hirnverletzungen. Bei ca. 13 200 Patienten wird ein schweres Schädel- Hirntrauma mit Glasgow- Coma- Score von ≤ 8 diagnostiziert. Allein 1994 verstarben ca. 10 000 Personen an den Folgen einer Hirnverletzung. Unter Berücksichtigung der prähospital Verstorbenen entspricht dies einer Gesamtmortalität von etwa 60%. Die weltweite Inzidenz des S. H. T. jährlich reicht von 9/ 100 000 Fällen in Großbritannien bis 32/ 100 000 in der Innenstadt von Chicago (Bennet et al.; 1989, Jennett et al.; 1990). Das Schädel- Hirntrauma ist weltweit bis zu einem Lebensalter von 45 Jahren die häufigste Todesursache (Gurdjian, 1978; Stat. Bundesamt, 1993-95). Bei den Verunfallten handelt es sich meist um junge, vor dem Insult gesunde Menschen (Häufigkeitsgipfel 15-25 Jahre), von denen sich nach einer amerikanischen Studien nur ca. 7 % zufriedenstellend erholen (Marshall et al., 1991). Von den 1994 mit schwerem SHT in deutsche Kliniken eingelieferten Patienten überlebten 1700 mit schwersten Behinderungen. Weitere 1400 bleiben auf permanente Hilfe angewiesen (Stat. Bundesamt 1993-95). Damit ist das SHT nicht nur ein medizinisches, sondern auch ein erhebliches gesellschaftliches Problem. Neben den aus der Hirnverletzung resultierenden Belastungen für Patienten und Angehörige, erleidet das Gesundheitssystem grosse finanzielle Verluste. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika werden schätzungsweise 20 Milliarden US \$ jährlich für Therapie und Nachsorge ausgegeben (Kraus et al.; 1994).

B. Der sekundäre Hirnschaden

Ursache für die hohe Mortalität (ca. 60 % s.o.) und die schlechte klinische Prognose des schweren SHTs ist nicht nur der im Augenblick des Unfalles entstehende zerebrale Primärschaden, sondern auch der nachfolgende sekundäre Hirnschaden u. a. durch das posttraumatische Hirnödem.

Demnach gibt es zwei Komponenten:

- den primären irreversiblen Hirnschaden im Augenblick der akuten Hirnverletzung (s. o.).
- den sekundären Hirnschaden, den als Folge der akuten Verletzung entstehenden weiteren Verlust von Hirngewebe bzw. Nervenzellen.

Der sekundäre Hirnschaden ist therapeutisch beeinflussbar und damit wichtiger Gegenstand der Forschung.

Der Primärschaden entsteht unmittelbar als Folge der Gewalteinwirkung. Beispiele hierfür sind, die fokale Kontusionsnekrose (Adams et al., 1984), der diffuse Axonschaden durch Dehnung und Zerreißung von Nervenfasern in der weißen Substanz (Adams et al., 1977; Povlishock, 1995), oder die Verletzung von Hirngefäßen als spätere Ursache einer Blutung (Baethmann et al., 1992; Baethmann et al., 1988).

Wichtige extrakranielle Mechanismen des sekundären Hirnschadens sind die systemische Hypoxie und arterielle Hypotension (Chesnut et al., 1993; Piek et al., 1992). Als wichtige intrakranielle Mechanismen des zerebralen Sekundärschadens gelten u. a. das traumatische Hirnödem und die intrakranielle Blutung als Raumforderung (Baethmann et al., 1988). Beide können zum Anstieg des intrakraniellen Drucks mit Abnahme des zerebralen Perfusionsdrucks führen -eine direkte Folge ist die Ischämie und Herniation des geschwollenen Gehirns in den Tentoriumschlitz oder das Foramen occipitale magnum (Povlishock 1995 und 2000). Neuropathologische Untersuchungen von Graham et al. an Patienten, die durch ein schweres

SHT gestorben sind, ergaben bei 88 bis 92 % sekundär ischämische bzw. hypoxische Veränderungen des Hirnparenchyms (Graham et al., 1978 und 1989).

Der sekundäre Hirnschaden hat somit ebenfalls einen massgeblichen Einfluss auf die Prognose des Patienten wie vollständige Rehabilitation, Defektheilung oder Tod. Der primäre Hirnschaden ist irreversibel und daher therapeutisch nicht beeinflussbar. Der sekundäre Hirnschaden dagegen kann prinzipiell behandelt werden - in der Klinik v.a. durch allgemeinmedizinische Maßnahmen, im Experiment durch „spezifische Methoden“.

An den Mechanismen des sekundären Hirnschadens sind u. a. Mediatorsubstanzen beteiligt, die im geschädigten Gewebe freigesetzt werden und als Bestandteil der Ödemflüssigkeit in das Hirnparenchym eintreten. Von zahlreichen Faktoren wie Arachidonsäure, Proteasen, Stickstoffmonoxyd (NO), freien Sauerstoffradikalen (Lewen; 2000, McIntosh 1996), Prostaglandinen, Leukotrienen, Neurotransmittern wie Glutamat (Park, 2000) oder dem Nonapeptid Bradykinin (Ellis 1989; Unterberg 1984) sind Mediatoreigenschaften berichtet worden. Zusätzlich können Störungen der Gewebshomöostase mit Verschiebung des intra/extrazellulären Na^+ / K^+ - Gleichgewichtes oder die Gewebeazidose bei der zytotoxischen Zellschwellung zum sekundären Hirnschaden beitragen. Eine typische Manifestation des Sekundärschadens ist die Vergrößerung (Wachstum) der Parenchymnekrose des Gehirns nach einem fokalen traumatischen Insult (Eriskat 1994; Kochanek 1995). Nach heutigem Kenntnisstand wird für den sekundären Verlust von Hirngewebe nach Trauma vor allem die Entwicklung von Durchblutungsstörungen des Gehirns - z. B. als Folge der Hirnschwellung mit Anstieg des intrakraniellen Drucks - verantwortlich gemacht.

Schädel-Hirntrauma-Pathophysiologie

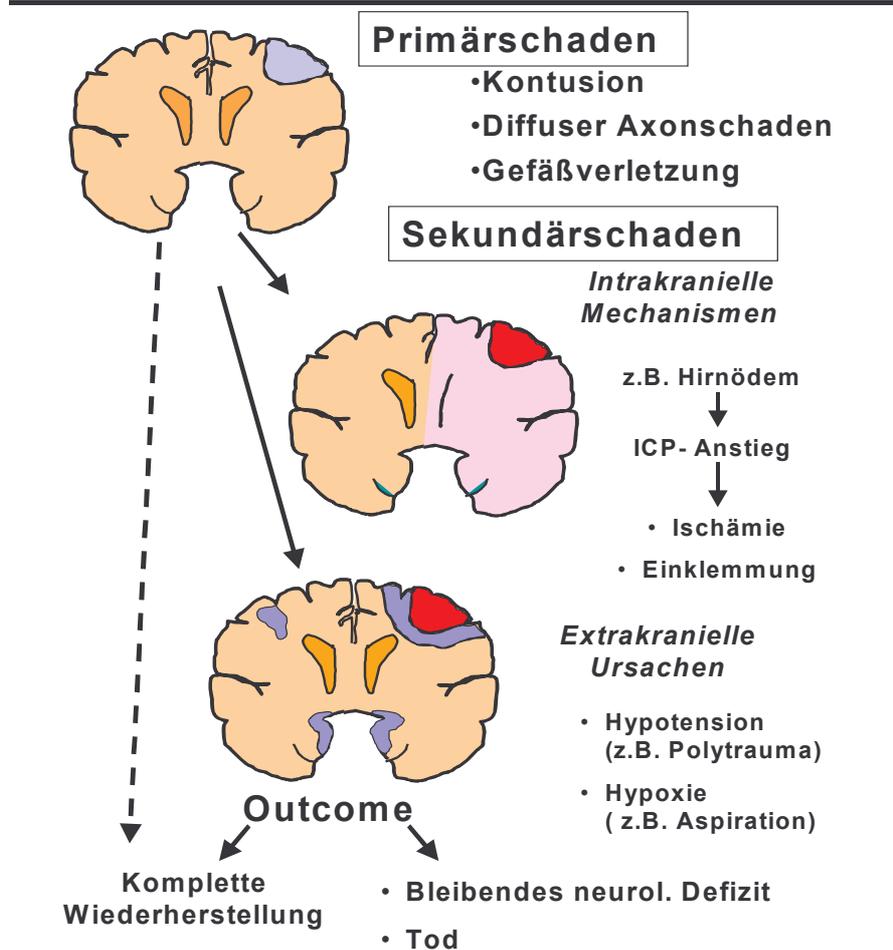


Abb.1: Zeitlicher Verlauf der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Trauma

Am Anfang entsteht der irreversible Primärschaden des Gehirns. Ausgelöst durch eine Kontusion oder eine Gefäßverletzung gefolgt von einer raumfordernden Blutung und einem posttraumatischen Hirnödem kommt es zum Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP). Das Versagen der intrakraniellen Compliance führt zum „Verbrauch“ der intrakraniellen Reserveräume als Grundlage der Ischämie. Eine weitere Folge ist die Herniation des Gehirns in den Tentoriumsschlitz oder das Foramen magnum. Extrakranielle Mechanismen wie die arterielle Hypotension (z.B. nach Polytrauma mit Blutverlust) oder eine pulmonale Hypoxie (z.B. nach Aspiration) sind an der Entstehung des sek. Hirnschadens ebenfalls beteiligt.

C. Das Hirnödeme

Das Hirnödeme ist einer der wichtigsten Mechanismen des sekundären Hirnschadens (Baethmann et al., 1989). Es entsteht mit Verzögerung nach dem primären Insult. Etwa 50 % der Patienten, die an der Folge eines schweren SHT versterben, haben zu meist einen therapieresistenten Anstieg des intracraniellen Drucks der eine traumatischen Hirnschwellung zugrunde liegt (Miller et al., 1977). Das Hirnödeme ist als Zunahme des Wassergehaltes des Gehirns definiert (Pappius et al., 1962). Von Klatzo sind das vasogene und zytotoxische Hirnödeme von einander unterschieden worden (Klatzo, 1967).

Charakteristikum des vasogenen Ödems ist die Akkumulation eines Plasmafiltrats im Extrazellulärraum des Hirnparenchyms nach Öffnung der Blut- Hirnschranke (Baethmann et al., 1980). Das zytotoxische Ödem hingegen ist (bei intakter Blut- Hirnschranke) eine Schwellung zellulärer Elemente, meistens von Astrozyten. Wenngleich beide Hirnödemeformen häufig gemeinsam vorkommen, steht zumindest initial das zytotoxische Ödem bei der zerebralen Ischämie im Vordergrund, während das vasogene Ödem zunächst bei SHT dominiert (Kimmelberg 1995). Das Versagen der Blut- Hirnschranke, welches dem vasogenen Hirnödeme vorausgeht, beruht auf einer traumatischen (oder ischämischen) Schädigung der Endothelzellbarriere (bevorzugt der postkapillären Venolen). Während die Bluthirnschranke bei Trauma durch den irreversiblen Parenchymuntergang im Augenblick des Insultes hervorgerufen wird, hängt die ischämische Schrankenstörung sehr wahrscheinlich mit der Entstehung der ischämischen Pannekrose bei der Infarzierung des Gewebes zusammen.

Welche biochemischen bzw. molekularen Detailmechanismen an der Öffnung der Blut- Hirnschranke beteiligt sind, ist nur ansatzweise bekannt. Das Nonapeptid Bradykinin, der aktive Metabolit des Kallikrein- Kinin Systems, spielt nach den Ergebnissen vieler Untersuchungen hierbei eine wichtige Mediatorenrolle (u.a. Maier- Hauff et al, 1984; Toda et al, 1977; Unterberg et al, 1994, 1985, 1986; Whittle 1992).

D. Das Kallikrein- Kinin System

Das Kallikrein- Kinin System wurde 1928 durch den Chirurgen Emil Karl Frey und den Physiologen Heinrich Kraut entdeckt. Beide Wissenschaftler der Ludwig- Maximilians Universität in München haben bei Hunden nach intravenöser Injektion von Urin einen Abfall des systemischen Blutdrucks beobachtet (Frey und Kraut 1928). Die durch periphere Vasodilatation hervorgerufene Hypotension konnte auf das Vorkommen von einer, später als Kallikreinen bezeichneten „Substanz“, im Urin zurückgeführt werden. Hierbei werden die aktiven Peptide (Kinine) wie Kallidin und Bradykinin von ihrer Vorstufe im Plasma abgespalten (Werle und Berek, 1948). Beide Kinine senken den Blutdruck durch Dilatation der Widerstandsgefäße. Inzwischen ist bekannt, dass die meisten pathophysiologischen Kininwirkungen durch das Nonapeptid Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) und sein Abbauprodukt Des-Arg⁹- Bradykinin sowie das Dekapeptid Kallidin hervorgerufen werden (Regoli, 1980).

1. Kininsynthese und Abbau

Bradykinin ist das am besten untersuchte Peptid des Kallikrein- Kinin Systems, das als Folge einer Gewebsschädigung oder durch andere Ursachen gebildet wird. Kinine unterstützen pathophysiologischen Prozesse, z.B. die akute Entzündung, haben eine starke noziozeptive Wirkung, erhöhen die Gefäßpermeabilität und fördern die Ödembildung (Bhoola 1992). Bei der Bildung von Kininen spielen verschiedene Reaktionsketten eine Rolle, je nach dem ob die Aktivierung im Gewebe oder im Plasmakompartiment abläuft. In den Blutgefäßen ist der durch einen Endothelschaden aktivierte Hagemannfaktor (Faktor XII) der erste Schritt zur Aktivierung des Kallikrein- Kinin Systems. Dabei wird im Blut zirkulierendes und an die inaktive Kallikreinvorstufe Präkallikrein gebundenes Kininogen (High Molecular Weight Kininogen, HMWK; MW 120 kDa) an die exponierte Basalmembran der geschädigten Endothelzelloberfläche angelagert. Aktivierter Faktor XII (Hagemann) spaltet aktives

Plasmakallikrein aus Präkallikrein (90 kDa) ab, das wiederum Bradykinin aus HMWK freigesetzt (Bhoola et al., 1992). Im Gewebe hingegen ist „Low Molecular Weight Kininogen“ (LMWK; 30 kDa) die wichtigste Vorstufe. Es repräsentiert ca. 70 % des Gesamtkininogens (Bartho and Proud, 1991). HMWK als auch LMWK werden durch alternatives Splicing des selben Gens exprimiert (Kitamura et al., 1983). Durch eine Gewebsschädigung freigesetzte proteolytische Enzyme aktivieren Präkallikrein, woraus Gewebekallikrein entsteht. Dieses Enzym spaltet Kallidin (Lysylbradykinin) von dem niedermolekularen Kininogen ab. Eine Ausnahme hierzu findet man allerdings bei der Ratte, bei welcher nach Gewebetrauma hauptsächlich Bradykinin aus LMWK freigesetzt wird (vgl. Bhoola et al., 1992). Eine weitere Alternative ist die Bildung von Kininen ohne Aktivierung von Kallikrein durch von Mastzellen oder Granulozyten freigesetzte Proteasen (Proud 1985). Der Abbau von Kallidin und Bradykinin erfolgt nach deren Bildung relativ schnell durch Kininasen. Bradykinin hat deshalb im Plasma oder nach intraventrikulärer Injektion in das Gehirn eine Halbwertszeit von weniger als 30 Sekunden (Kariya et al., 1982).

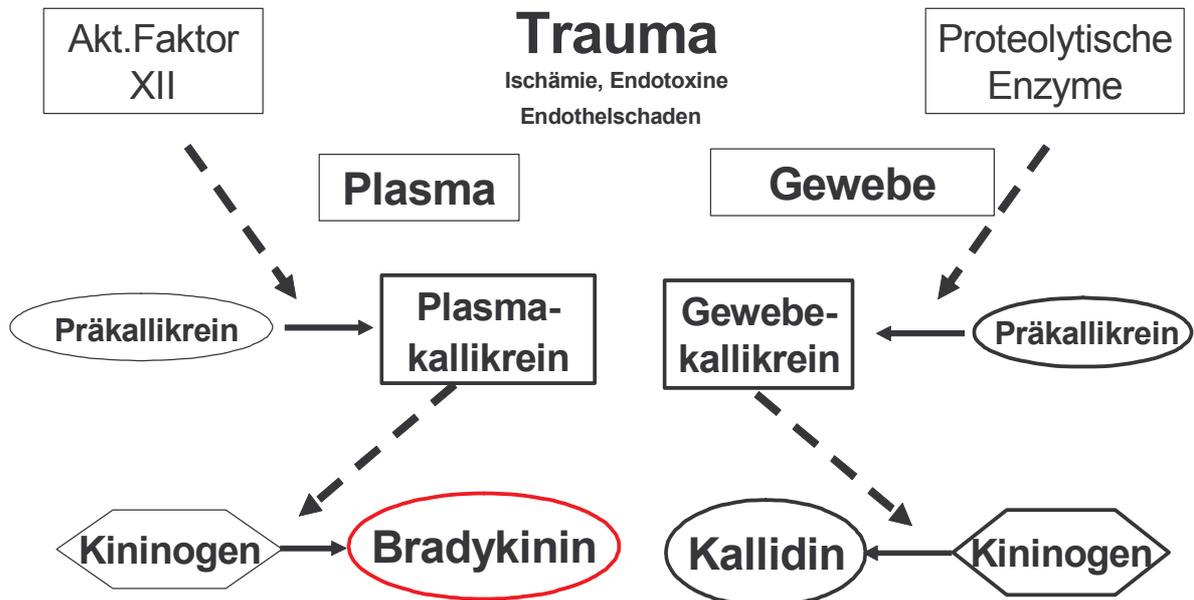


Abb 2: Schematische Darstellung der Kininsynthese

Trauma, Ischämie oder Endotoxin sind u.a. Auslöser der Kininproduktion. Das komplette zur Bildung von Kininen erforderliche System ist sowohl im Gewebe als auch im Blut vorhanden.

Im Gewebe ist niedermolekulares Kininogen die Vorstufe der Kinine. Durch eine Gewebsschädigung freigesetzte proteolytische Enzyme aktivieren Präkallikrein. Es entsteht aktives Gewebekallikrein, das aus niedermolekularem Kininogen Kallidin freisetzt.

Initialer Schritt im Plasma ist die durch einen Endothelschaden ausgelöste Aktivierung von Hagemanfaktor (Faktor XII). Dieser spaltet Plasmakallikrein aus Präkallikrein ab das seinerseits Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen freisetzt.

2. Kininrezeptoren

Die biologische/ pathophysiologische Wirkung von Bradykinin wie auch von Kallidin erfolgt durch Bindung an spezifische Rezeptoren, dem (Bradykinin) B1- und (Bradykinin) B2-Rezeptor. Beide gehören der Superfamilie von G- Protein gekoppelten Rezeptoren an. Die Rezeptorbindung von BK (B1- und B2- Rezeptor) aktiviert die Phospholipase C. Als Folge entstehen aus Membranlipiden u. a. Diacylglycerin (DAG) und Inositol 1,4,5- triphosphat als second messenger, sowie die hoch ungesättigte freie Fettsäure Arachidonsäure. Im Gegensatz zu B2- werden B1- Rezeptoren nur als Folge einer Gewebsschädigung oder bei der Entzündung exprimiert. Dieses haben Untersuchungen mit isolierten Geweben ergeben (Regoli et al., 1980, 1990). Der vermutlich wichtigste B1- Rezeptorligand ist das des- Arg9- Bradykinin, ein Abbauprodukt des Bradykinins. B2- Rezeptoren sind ubiquitär verbreitet, sie finden sich u. a. in der Lunge, im Gefäßsystem und dem Gastrointestinaltrakt (Hall 1992). Der wichtigste Ligand des B2- Rezeptors ist Bradykinin. Der B2- Rezeptor vermittelt die meisten Bradykinin-induzierten Effekte wie Vasodilatation von intra- und extracerebralen Arterien (Rosenblum 1986; Wahl 1983), Schmerz (Gecse 1989) und die Zunahme der Gefäßpermeabilität- auch die der Bluthirnschranke (Mayhan 1996; Schilling und Wahl 1997; Unterberg 1984; Wahl 1993; Whittle 1992).

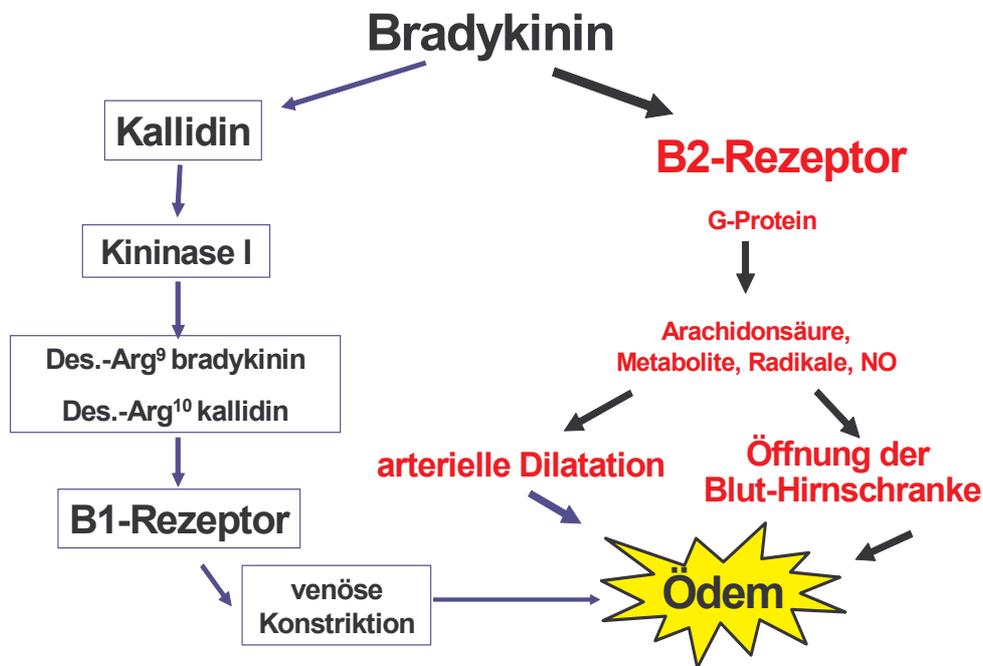


Abb 3: Schematische Darstellung der rezeptorvermittelten Kininwirkung

Die spezifische Wirkung von Kininen erfolgt rezeptorvermittelt über B1- und B2-Rezeptoren.

Der B1-Rezeptor bindet zwei aktive Metabolite des Kallikrein- Kinin Systems, des-Arg⁹ bradykinin und des- Arg¹⁰ kallidin. Die Ligandenbindung des B1-Rezeptors führt zur arteriellen wie auch zu einer venösen Gefäßkonstriktion. Der Rezeptor wird unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert, sondern z.B. erst durch eine Entzündung. Im Gegensatz zum B1-Rezeptor bindet der B2- Rezeptor Bradykinin als spezifischer Ligand. Die G-Protein gekoppelten Kininrezeptoren vermitteln ihre Wirkung durch "second messenger" wie: NO, Prostanoid, freie Radikale oder Leukotriene. Die Bradykininbindung des B2- Rezeptors führt zu einer vermutlich NO- vermittelten Dilatation extra- und intraparenchymaler zerebraler Arterien. Ein weiterer, an der Hirnödementwicklung beteiligter Mechanismus ist die selektive Öffnung der Blut-Hirnschranke. Das durch Bradykinin induzierte Hirnödem kann durch ein B2- Rezeptor vermitteltes Zusammenwirken von erhöhter Schrankenpermeabilität und dem erhöhten transmuralen Druckgradienten im Bereich der Mikrogefäße als Folge der arterieller Dilatation erklärt werden.

3. Bradykinin im Gehirn

Bradykinin ist ein hochwirksamer Mediator, der früh nach einer Gewebsschädigung freigesetzt wird. Seit langem ist bekannt, dass das Peptid ein großes entzündungs- und schmerzinduzierendes Potential hat (Bhoola et al., 1992). Auch aus diesem Grund ist das KK- System seit längerem Gegenstand intensiver Forschung (Übersicht Baethmann, 1992; Francel, 1992; Walker, 1995; Plesnila, 2002). Die ersten Untersuchungen haben sich allerdings zunächst auf periphere Organe beschränkt. Erst später wurde beobachtet, dass das KK- System v. a. unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Mediatorrolle im Zentralnervensystem spielt (Walker 1995; Privitera, 1992; Unterberg 1983, 1984, 1985). Die Komponenten des KK- Systems wurden im ZNS verschiedener Spezies - auch beim Menschen - nachgewiesen (Walker 1995). B2-Rezeptoren finden sich in Neuronen des Hirnstamms, der Basalganglien, dem zerebralen Kortex, Thalamus und Hypothalamus (Raidoo und Bhoola, 1997) ebenso wie in Astrozyten (Hösli, 1992, 1993) und Oligodendrozyten (Stephens 1993).

E. Ziel der Arbeit

Bisher gibt es keine klinisch etablierte spezifische Therapie des traumatischen Hirnödems. Steroide wirken bevorzugt bei Tumoren des Gehirns. Nach Empfehlung anerkannter Organisationen wie der AANS (American Association of Neurological Surgeons) oder der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften), (AANS 1995; AWMF Leitlinien, 1997) stützt sich die Behandlung des akuten SHT vor allem auf die Senkung des intrakraniellen Drucks z. B. durch Osmodiuretika, milde Hyperventilation, hyperosmolare Lösungen oder die chirurgische Entlastung durch Kraniotomie. Eine Verbesserung der klinischen Behandlung zur Prävention des sekundären Hirnschadens macht somit eine wirksame Therapie des traumatischen Hirnödems durch zusätzliche

Behandlungsmethoden erforderlich, die spezifischer wirken als bisherige. Voraussetzung hierfür ist die der Pathophysiologie zugrunde liegenden Mechanismen – einschließlich beteiligter Mediatoren zu kennen. Das Nonapeptid Bradykinin hat hier nach gegenwärtigem Wissensstand eine Schlüsselfunktion. Bradykinin B2- Rezeptoren sind an den akuten Entzündungsmechanismen der Nozizeption beteiligt. Ihre Aktivierung durch Bindung von Bradykinin führt zur Dilatation von extra- und intraparenchymalen Hirnarterien und selektiven Öffnung der Blut-Hirnschranke. Das durch Bradykinin induzierte Hirnödem kann daher als B2- Rezeptor vermittelt definiert werden. Ein sinnvoller Ansatz der therapeutischen Hemmung des traumatischen Hirnödems wäre deshalb die Blockade des Bradykinin B2 -Rezeptors.

Das Ziel dieser Arbeit war somit

die Prüfung der therapeutischen Wirksamkeit der selektiven Bradykinin B2- Rezeptorblockade beim vasogenen Hirnödem mit Hilfe des neuen selektiven Bradykinin B2- Rezeptorantagonisten LF160687MS.

II. Material und Methoden

A. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 61 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Kisslegg/Allgäu) mit einem Durchschnittsgewicht von 250- 300 g verwendet.

B. Versuchsablauf

1. Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere in einen mit Halothan/ Raumluft (4%/ 96%) gefluteten Plexiglasbehälter gesetzt. Die narkotisierten Tiere wurden unter mikroskopischer Sicht mit einem Silikontubus (Länge: 2 cm; Durchmesser: 1,2 mm) endotracheal intubiert und anschließend mit einem Gemisch von 0,8% Halothan, 30% O₂ und 69% N₂O maschinell beatmet. Die Körpertemperatur wurde mit einer thermostatregulierten Heizmatte (Fa. Effenberger, München) konstant zwischen 37,5° bis 38,5° gehalten.

2. Präparation

Im Anschluss an die Intubation wurde ein arterieller Zugang über die Schwanzarterie gelegt. Hierzu wurde eine gekürzte Injektionskanüle der Stärke 14 (Sterican® Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Über den Stumpf wurde ein Polyäthylenkatheter (Portex®, Fa. Portex Limited, Hythe, England, Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm) gezogen und das Katheterende angeschrägt. Daraufhin wurde die Schwanzarterie von ventral dargestellt, distal ligiert und mit einer Mikroschere eröffnet. Das Katheterende wurde in das Gefäßlumen eingeführt, ca. 1,5 cm proximal vorgeschoben und mit Haltefäden fixiert. Der arterielle Katheter war für die kontinuierliche Blutdruckmessung sowie für die Gewinnung von arteriellen Blutproben zur Bestimmung von Blutgasen, Blutzucker und Hämatokrit erforderlich.

Anschließend erfolgte die Präparation des zentralvenösen Zuganges. Hierzu wurde eine Injektionskanüle der Stärke 20 (Sterican® Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) nach der oben genannten Kathetermethode mit einem Polyäthylenkatheter (Portex®, Fa. Portex Limited, Hythe, England, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm) verbunden. Nach Hautschnitt wurde die rechte Vena jugularis externa dargestellt, ligiert und proximal eröffnet. Der durch die Öffnung eingeführte Katheter wurde bis zum rechten Vorhof vorgeschoben. Das distale Katheterende wurde subcutan nach dorsal zwischen die Schulterblätter geführt und nach Stichinzision durch die Rückenhaut ausgeleitet. Die Stichwunde wurde chirurgisch durch Naht versorgt. Um den Katheter vor einer Beschädigung durch das Versuchstier zu schützen, erhielt er eine elastische Stahlspirale als Manschette, die mit der Rückenhaut vernäht wurde. Durch diese Vorrichtung war eine Dauerinfusion bei nahezu uneingeschränkter Bewegungsfreiheit des Versuchstiers gewährleistet.

Der arterielle Katheter wurde durch Infusion isotoner Kochsalzlösung (0,5 ml/ h) offen gehalten. Der venöse Katheter war zur Applikation der für den Versuch benötigten Pharmaka. erforderlich. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde eine mit der Heizmatte gekoppelte rektale Temperatursonde verwendet.

3. Fokale Kälteläsion

Der Kopf des narkotisierten Versuchstiers wurde in einer stereotaktischen Halterung (Fa. Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA) fixiert, die Kopfhaut entlang der Medianlinie inzidiert, das Periost entfernt und das linke Os parietale freigelegt. Anschließend wurde eine kreisförmige Trepanation (Ø 5mm) 3 mm lateral und caudal des Bregmas mit Hilfe eines wassergekühlten Zahnarztbohrers präpariert. Der Knochendeckel wurde sorgfältig entfernt, die Dura mater blieb unversehrt. Die Läsion erfolgte durch lokale Vereisung der Hirnrinde. Für diesen Zweck wurde ein runder Kupferhohlzylinder mit Aceton-Trockeneisgemisch auf -68°C tiefgekühlt (Abb. 5),

dessen Spitze (\varnothing 4,5 mm) mit Hilfe eines Mikromanipulators der Dura plan aufgesetzt wurde. Zur Verdrängung des subarachnoidalen Liquorkissens hatte die Kühlsonde eine Eindringtiefe von + 0,5 mm. Die Kontaktzeit von Kühlzylinder und Dura betrug exakt 15 Sekunden. Zur Gewährleistung der präzisen Positionierung und Kontaktzeit wurde die Läsion mit Hilfe eines computergesteuerten Systems erzeugt. Das Programm hierfür ist von Dr. J. Eriskat in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden.

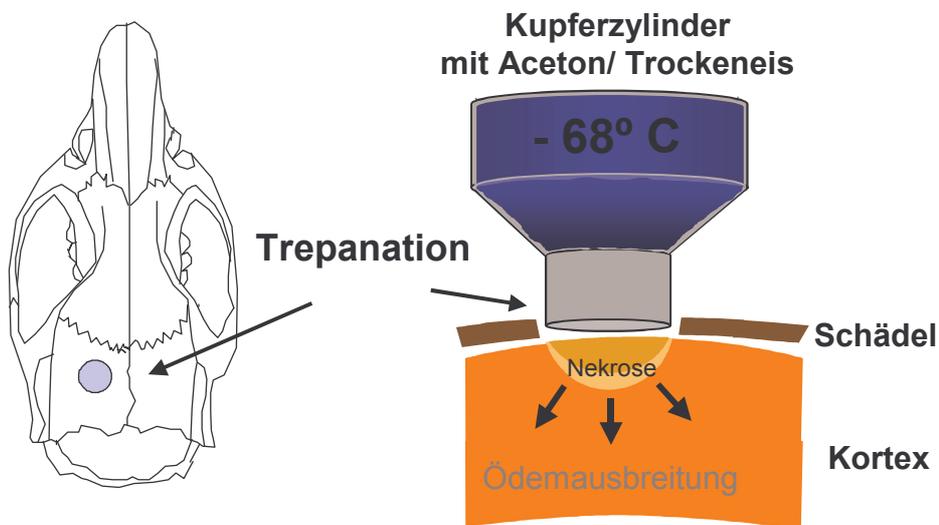


Abb.5

Links: Schematische Darstellung eines Rattenschädels in der Aufsicht

Mit Hilfe eines wassergekühlten Zahnarztbohrers wurde eine Trepanation über dem linken Os parietale angelegt. Als Orientierungshilfe dienten die Sutura sagitalis und die Sutura coronaria.

Rechts: Schematische Darstellung des Kältetraumas

Ein runder Kupferhohlzylinder wurde mit einem Gemisch aus Trockeneis und Aceton gefüllt und dadurch auf -68°C abgekühlt. Die Stempelfläche (\varnothing 4,5 mm,) wurde stereotaktisch unter Verwendung eines Mikromanipulators auf die Dura mater plan aufgesetzt. Anschließend erfolgte eine Absenkung um 0,5 mm um das subarachnoidale Liquorkissen zu verdrängen. Als Folge der Kälteläsion (Dauer 15 sek.) entsteht eine makroskopisch abgrenzbare Parenchymnekrose des Gehirns.

4. Posttraumatische Phase

Nach Induktion der Läsion wurde die Kopfschwarte durch Naht verschlossen. Die Narkose wurde für 30 Minuten zur Überwachung von Körpertemperatur und Blutdruck fortgesetzt. Danach wurde der arterielle Katheter gezogen, das Gefäß ligiert und die Hautinzision vernäht. Nach Extubation erwachten die Tiere ca. 10 Minuten nach Beendigung der Narkose. Für die folgenden 24 Stunden wurden sie in Einzelkäfigen mit Zugang von Futter und Wasser gehalten. 24 Stunden nach Trauma wurden die Tiere mit Chloralhydrat ip. in einer Dosierung von 360 mg/100 g Körpergewicht narkotisiert und im Anschluss dekapitiert. Dem rechten Herzventrikel wurden 2 ml Blut entnommen, das heparinisiert und zentrifugiert (6 min. bei 5000 U/min) wurde. Im überstehenden Plasma wurde die Konzentration des B2- Rezeptorantagonisten LF 160687MS bestimmt.

5. Entnahme des Gehirns - Trennung der Hirnhemisphären

Nach Entbluten des Tieres wurde die Schädelkalotte eröffnet und das Gehirn von den Hirnhäuten befreit. Durch einen Schnitt in der Coronarebene, kaudal der Bulbi olfactorii, wurde das Frontalhirn vom Rhinenzephalon getrennt. Anschließend wurde das Corpus pineale entfernt und das Kleinhirn zur Darstellung der Lamina quadrigemina des Mesencephalons behutsam nach kaudal gedrängt. Das Großhirn wurde caudal der Colliculi inferiores durch einen Schnitt senkrecht zur Achse des Hirnstammes und rostral zur Pons abgesetzt. Die beiden Sehnerven wurden ca. 1,5 mm distal des Chiasma opticum durchtrennt. Das auf diese Weise sorgfältig mobilisierte Gehirn, wurde als ganzes für die exakte Trennung der Hemisphären entnommen. Zur Gewährleistung einer präzisen Schnittführung hat der Autor für diese Versuche eine aus transparentem Kunststoff gefertigte Form entwickelt (Abb. 6). Es handelt sich um eine Weiterentwicklung der von U. v. Andrian (Andrian 1992) eingeführten Gipsform des Abdruckes eines in Formalin fixierten Rattengehirnes. Das intakte Gehirn wurde nach Entnahme in dieser

Form positioniert. Zur präzisen Trennung der traumatisierten von der kontralateralen Hirnhemisphäre (Kontrolle) wurde eine Rasierklinge durch einen entlang der Medianebene des Hirnabdruckes gefrästen Führungsschlitz gezogen. Dieses Verfahren war Voraussetzung für die symmetrische Trennung der Hemisphären und damit Grundlage der gravimetrischen Bestimmung der Schwellung der traumatisierten (exponierten) Hirnhemisphäre.

6. Ermittlung des hemisphärischen Wassergehaltes

Nach exakter Trennung der Hemisphären wurden diese in ein durch einen Deckel verschließbares Waageschälchen aus Glas gelegt, zur Ermittlung des Frischgewichts gewogen und danach für 24 Stunden bei geöffnetem Deckel in einem Wärmeschrank bei 110° getrocknet. Die Bestimmung des Trockengewichtes erfolgte durch erneutes Wiegen.



Abb. 5a.: Die Abbildung zeigt ein fixiertes Rattengehirn, das in die von v. Andrian entwickelte Gipsform positioniert wurde. Die mediane Einkerbung der Forn dient als Führung für die Hemisphärentrennung (Photo M. Stoffel).



Abb.5b: Die vom Autor für diese Versuche entwickelte Form zur Hemisphärentrennung aus transparentem Kunststoff, in den der Abdruck eines Rattengehirns eingearbeitet ist. Entlang der Falx cerebri ist ein Führungsschlitz eingefräst, der in etwa der Klingienstärke des verwendeten Schnittinstruments entspricht. Entscheidender Vorteil gegenüber der, in den bisherigen Versuchen verwendeten Gipsform ist es, die Lage des Gehirns in allen drei Ebenen beurteilen zu können. Somit konnte die Schnittführung bei der Hemisphärentrennung exakt kontrolliert werden. Des weiteren wurde ein Anhaften von Hirngewebe an der Form durch die hydrophobe Kunststoffoberfläche verhindert.

C. Versuchsgruppen

1. Vor- und Nachbehandlung mit LF 160687MS

Für den ersten Versuchsteil wurden die Tiere randomisiert drei Gruppen (jeweils n=10) zugeordnet. Der Wirkstoff LF 160687MS wurde in einer Dosierung von 10 µg/kg/Min. bzw. 100 µg/kg/Min. oder NaCl als Kontrolle in die rechte Jugularvene infundiert.

Das Mesylatsalz (LF 160687MS) wurde zuvor in 10 ml 0,9% NaCl gelöst. Die Behandlung wurde 10 min. vor Trauma begonnen und bis 24 Std. danach als Dauerinfusion kontinuierlich weitergeführt. LF 160687MS erreicht bereits 5 Minuten nach Infusionsbeginn einen wirksamen Plasmaspiegel (Pruneau et al.1999). Der B2- Rezeptorantagonist wurde als kontinuierliche Dauerinfusion appliziert.

Auch wenn der Beginn der Behandlung vor Trauma nicht der klinischen Situation beim SHT entspricht, sollte mit diesem Vorgehen die prinzipielle Wirksamkeit des Pharmakons unter optimalen Bedingungen geprüft werden (Proof of principle). Die Behandlung einer Hoch- und Niedrigdosisgruppe war zur Festlegung der optimalen Dosis notwendig.

Der arterielle Blutdruck und die Körpertemperatur wurden von Präparationsbeginn an bis 30 Minuten nach Trauma kontinuierlich gemessen. Blutproben zur Blutgasanalyse und Hämatokritbestimmung wurden vor und nach Trauma entnommen.

24 Stunden nach Trauma erfolgte die Dekapitation und Hirnentnahme bei erneut narkotisierten Tieren.

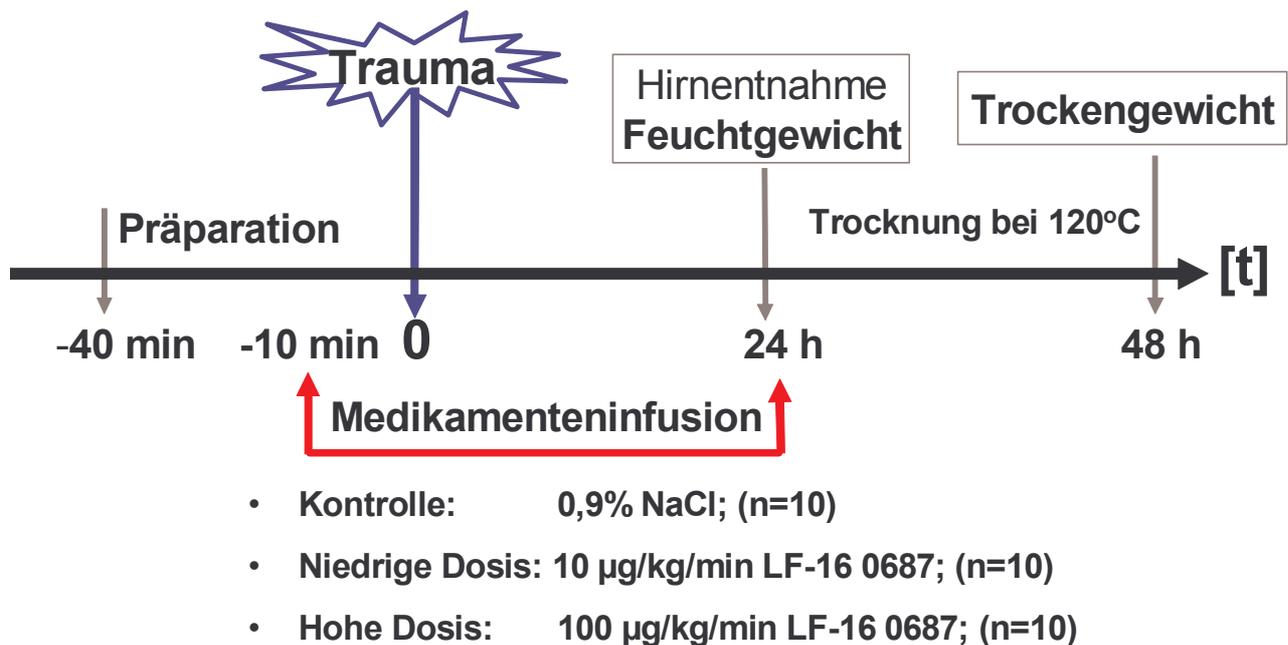


Abb.8: Versuchsprotokoll bei Vor- und Nachbehandlung mit LF 160687MS

Nach Präparation und Trauma wurde die Narkose beendet und die Tiere erwachten.

24h Stunden später wurden die Tiere in Narkose dekapitiert, das Gehirn sorgfältig ohne Beschädigung aus dem Schädel gelöst und entlang der Mittellinie symmetrisch geteilt. Die getrennten Hemisphären wurden gewogen und anschließend für 24h bei 120°C getrocknet um die Feucht- Trockengewichtsdifferenz zu ermitteln. Die Infusion des B2-Rezeptorantagonisten wurde 10min. vor Trauma begonnen und bis 24h nach Trauma fortgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte blind. Zwei Gruppen erhielten LF 160687MS in einer Konzentration von 10 µg/ kg/min. bzw. 100µg/ kg/min., während die Tiere einer dritten Versuchsgruppe mit Trauma mit isotoner Kochsalzlösung infundiert wurden.

2. Nachbehandlung mit LF 160687MS

Um die Wirksamkeit des Bradykinin B₂- Rezeptorantagonisten unter klinisch relevanten Bedingungen zu prüfen, wurde in weiteren Versuchen mit der Therapie 30 Min. bzw. 60 Min. nach Trauma begonnen.

Die Tiere der Therapiegruppen (jeweils n=10) erhielten LF 160687MS in einer Dosierung von 10µg/kg/min. als Dauerinfusion in die rechte Vena jugularis. Die Tiere der Kontrollgruppe (n=10) wurden mit NaCl- Lösung infundiert. Der Versuchsablauf entsprach dem unter dem C.1. dargestellten Protokoll.

Die Versuchstiere waren den Gruppen randomisiert zugeteilt, die Versuche wurden „blind“ nach Kodierung der Tiere durchgeführt. Der Untersucher wurde erst nach Auswertung der Ergebnisse über deren Zuordnung in Kenntnis gesetzt.

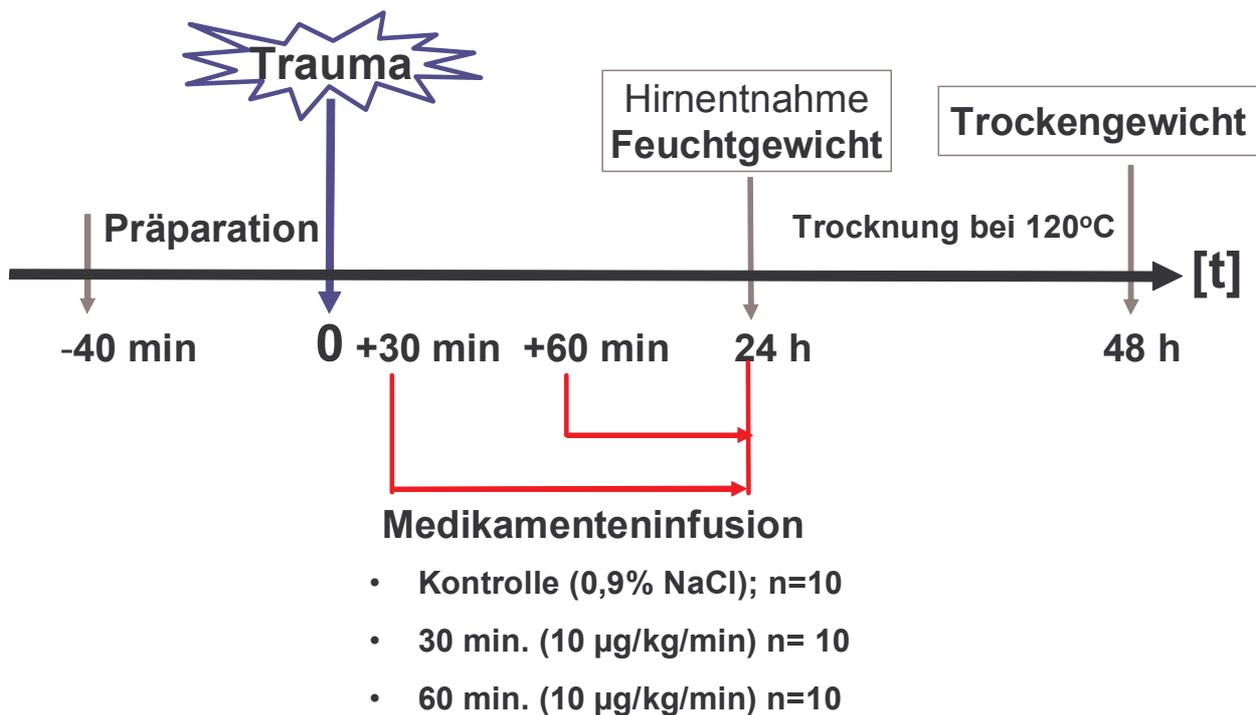


Abb. 9: Versuchsprotokoll der Wirksamkeitsprüfung des B2-Rezeptorantagonisten bei Infusionsbeginn nach Trauma

In dieser Versuchsreihe wurde die Infusion des Rezeptorantagonisten 30 bzw. 60 min. nach Trauma begonnen und kontinuierlich bis 24h nach Trauma fortgeführt.

Die im 1. Versuchsteil gefundene wirksamste Dosierung von 10µg/kg/min. wurde verwendet.

Die Tiere wurden randomisiert drei Gruppen (n=10) zugeteilt. Die Infusion von isotoner Kochsalzlösung diente als Kontrolle.

D. Untersuchungsmethoden

1. Ermittlung des Hemisphärgewichts (Frischgewicht)

Unmittelbar nach symmetrischer Trennung in der Medianebene wurden die Hirnhemisphären in verschliessbare Wägeschälchen aus Glas verbracht.

Die Wägeschälchen wurden zuvor für 24 Stunden bei 110° in einem Wärmeschrank (Fa. Memmert, Schwabach) getrocknet und anschließend in einem Exsikkator auf Raumtemperatur gekühlt. Das Leergewicht des Schälchens wurde mit einer elektronischen Waage (Fa. Mettler) ermittelt. Anschließend wurden die luftdicht verschlossenen Schälchen mit der Gewebsprobe erneut gewogen. Das Frischgewicht der Hirnhemisphären ergab sich aus der Differenz der Schälchen mit und ohne Gewebe. Zusätzlich wurde von jedem Tier 1 ml heparinisiertes frisches Plasma eingewogen.

2. Wassergehalt von Hirngewebe und Plasma

Die Hirnhemisphären (analog Plasma) wurden bei 110°C für 24 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (Reulen et al., 1969). Der Hemisphären- Wassergehalt (bzw. der des Plasmas) lässt sich als Differenz von Frisch (F)- und Trockengewicht (T) in Prozent des Frischgewichtes der Hemisphäre (Plasmaprobe) berechnen (s. u.).

$$\text{Wassergehalt [\%]} = \frac{F - T}{F} * 100$$

Die durch das Hirnödem bedingte Zunahme des Wassergehaltes der traumatisierten Hemisphäre wird bestimmt als Differenz des Wassergehaltes der traumatisierten (WG_t) und der nicht traumatisierten kontralateralen Hemisphäre (WG_k):

$$\text{Wasseraufnahme}[\%] = WG_t - WG_k$$

3. Hemisphärenschwellung:

Die quantitative Gewichtszunahme der traumatisierten Hemisphäre gegenüber der nicht traumatisierten Kontrollhemisphäre beruht auf dem Influx des Hirnödems. Unter Berücksichtigung des durch Gravimetrie ermittelten Frischgewichts der traumatisierten sowie der kontralateralen Kontrollhemisphäre kann der Influx des Hirnödems, die Schwellung der traumatisierten Hemisphäre mit guter Empfindlichkeit bestimmt werden (Unterberg et al, 1986 und 1987). Die Schwellung entspricht der Gewichts­differenz von Trauma und Kontrollhemisphäre (Abb. 10).

$$\text{Schwellung} [\%] = \frac{Tr_f - Ko_f}{Ko_f} * 100$$

Tr_f = Frischgewicht traumatisierte Hemisphäre

Ko_f = Frischgewicht Kontrollhemisphäre

Gravimetrische Bestimmung der Hemisphärenschwellung

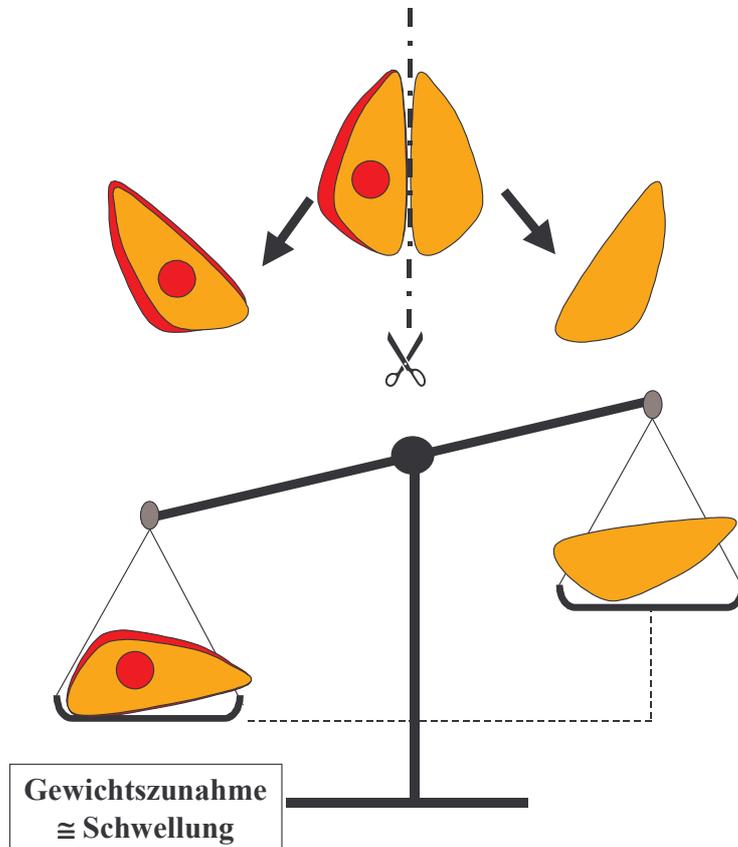


Abb.10: Graphische Erläuterung der Hemisphärenschwellung (aus v. Andrian 1992)

Nach Applikation des Kältetraumas entwickelt die exponierte Hemisphäre eine deutliche Schwellung als Ursache der Zunahme des Feuchtgewichts (rot dargestellt).

Nach Trennung des Gehirns in der Medianebene werden beide Hemisphären zur Ermittlung der Gewichts Differenz zwischen traumatisierter und kontralateraler Hirnhälfte gewogen. Die Gewichts Differenz entspricht bei exakter Schnittführung dem Gewicht der vasogenen Ödemflüssigkeit und reflektiert damit die posttraumatische Hemisphärenschwellung.

4. Korrigierte Schwellung - Berechnung

Das Hirngewicht einer Ratte beträgt im Mittel nur 1,5g. Bei der Hemisphärentrennung können selbst geringfügige Abweichungen der Schnittführung von der Medianebene zu einem erheblichen Fehler bei der Berechnung der Hemisphärenschwellung führen. Zur Beseitigung diesen Trennungsfehlers wurde von U. v. Andrian und J. Peters eine Korrekturformel wie folgt entwickelt (v. Andrian, 1992).

5. Korrigierte Schwellung- Verringerung des Trennfehlers

- a. Die Standardisierung von Hirnentnahme, Hemisphärentrennung sowie Trocknung und Einwaage des Gehirns sind wesentliche Faktoren, um diesen Fehler zu reduzieren.
- b. Eine Korrekturformel zur Bestimmung der „korrigierten Schwellung“ erlaubt den individuellen Trennfehler rechnerisch zu eliminieren.

Zu a: Um die Reproduzierbarkeit der Hemisphärenschwellung mit Hilfe der verwendeten Methoden exakt beurteilen zu können, wurde in Vorversuchen bei 7 Ratten das Gehirn nach dem o.g. Verfahren entnommen und getrennt. Diese Kontrolltiere waren weder kraniotomiert noch hatten sie eine Kälteläsion des Gehirns.

Das mittlere Feuchtgewicht des ganzen Gehirns betrug 1482 ± 96 mg (MW \pm Standardabweichung). Die linke Hemisphäre war um durchschnittlich $10,08 \pm 7,18$ mg (MW \pm Standardabweichung) schwerer als die rechte .

Daraus resultiert links ein um durchschnittlich 1,37% höheres Feuchtgewicht. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bei Ratten u. a. auch die von U. v. Andrian. Dieser Gewichtsunterschied wird auch bei anderen Säugetieren, sowie beim Menschen festgestellt. Es scheint sich hierbei um eine physiologische Norm zu handeln. Die physiologische Gewichts Differenz von rechter und linker Hirnhemisphäre wurde für die Berechnung der

posttraumatischen Schwellung allerdings nicht berücksichtigt. Ein hieraus resultierender systematischer Fehler, der die Tiere aller Versuchsgruppen betreffen würde, hätte dazu führen können, dass die Hemisphärenschwellung geringfügig zu hoch bestimmt wird. Die in den Voruntersuchungen ermittelte Standardabweichung des durchschnittlichen Gewichtsunterschieds zwischen linker und rechter Hemisphäre entspricht etwa 0.48% des Hirngewichtes. Sie kann als Maß für den gesamten zufälligen Fehler aller beteiligten Methoden, wie Hirnentnahme, Hemisphärentrennung oder Einwaage angesehen werden.

Zu b: Zur rechnerischen Eliminierung des durch Abweichung der Schnittführung von der Medianebene entstandenen Trennfehlers wurde ein Faktor bestimmt, mit dessen Hilfe dieser Fehler bei der Errechnung der Hemisphärenschwellung korrigiert werden kann. Dieser Faktor, Trennfehler Tf_f , stellt das Feuchtgewicht desjenigen Gewebeanteils dar, der von der Abweichung der Schnittführung von der Medianebene betroffen ist.

Nach Einsetzen dieses Faktors in die o.g. Gleichung, ergibt sich folgende Umformung zur Berechnung der korrigierten Schwellung:

$$\text{Korrigierte Schwellung [\%]} = \frac{(Tr_f - Tf_f) - (Ko_f - Tf_f)}{Ko_f + Tf_f} * 100$$

Nach Auflösung der Klammern ergibt sich:

$$\text{Korrigierte Schwellung [\%]} = \frac{Tr_f - Ko_f - 2Tf_f}{Ko_f + Tf_f} * 100$$

Der individuelle Trennfehler konnte von U. v. Andrian und J. Peters mathematisch bestimmt werden. Hierzu wurde folgende Annahmen vorausgesetzt:

1. Annahme:

Beide Hemisphären des Gehirns haben das gleiche Feuchtgewicht. Für die Gewichts­differenz zwischen zwei Hemisphären eines traumatisierten Gehirns gilt dann:

$$I. \quad Tr_f - Ko_f = \ddot{O}_f + 2 Tf_f$$

„ \ddot{O}_f “ stellt das Feuchtgewicht der Ödemflüssigkeit dar.

2. Annahme:

Der Wassergehalt beider Hemisphären eines normalen Gehirns ist identisch. Deshalb ist auch das Trockengewicht gleich.

Deshalb gilt:

$$II. \quad Tr_f - Ko_f = \ddot{O}_f + 2 Tf_t$$

Index „t“ charakterisiert die Größe als Trockengewicht.

3. Annahme:

Die Ödemflüssigkeit ist ein Filtrat des Plasmas - daher muss ihre Zusammensetzung (Wasser- und Trockengewichtsanteil) von der des Plasmas direkt abhängen.

Plasma sowie der Trockengewichtsanteil (d.h. die nicht verdampf­baren Anteile) der Ödemflüssigkeit bestehen aus Salzen und Proteinen.

$$III. \quad \ddot{O}_t = 0.58 * \frac{Pl_f}{Pl_t} * \ddot{O}_f$$

Der Eiweißgehalt der Ödemflüssigkeit (entsprechend dem Trockengewichtsanteil) liegt bei 58% des Plasmaeiweißgehaltes. Dieses wurde von zwei Arbeitsgruppen (Clasen et al., 1967; Gazendam et al., 1979) in unabhängigen Verfahren ermittelt. Für die Berechnung mit Hilfe der Korrekturformel konnte daher angenommen werden, dass Ödemflüssigkeit 58% des Trockengewichts von Plasma hat:

4. Annahme:

Der Wassergehalt des durch fehlerhafte Trennung betroffenen Hirngewebes Tf_f entspricht dem Wassergehalt der nicht traumatisierten Hemisphäre. Grundlage für diese Annahme ist, dass durch die ungenaue Trennung v.a. Hirnstrukturen wie Corpus callosum, Mittelhirn und Hypothalamus betroffen sind, die geringfügige Mengen Ödemflüssigkeit enthalten.

$$IV. \quad Tf = \frac{Ko_t}{Ko_f} * Tf_f$$

Daher folgt:

Durch mathematische Umformung der Gleichungen I- IV lässt sich der individuelle Trennungsfehler (Tf_f) für jedes Tier individuell ermitteln.

$$Tf_f = 0.5 * \left(Tr_f - Ko_f - \frac{\frac{Ko_f}{Ko_t} * (Tr_t - Ko_t) - Tr_f + Ko_f}{0.58 * \frac{Pl_t}{Pl_f} * \frac{Ko_f}{Ko_t} - 1} \right)$$

In der oben beschriebenen Gleichung zur Ermittlung der korrigierten Schwellung wurde der Trennungsfehler (Tr_f) durch den zuletzt hergeleiteten Term ersetzt. Nach dem Kürzen des Bruchs erhalten wir die vereinfachte, endgültige Gleichung zur Berechnung der vom individuellen Trennungsfehler bereinigten und korrigierten posttraumatischen Hemisphärenschwellung.

$$k.S. [\%] = \frac{\frac{Ko_f}{Ko_t} * (Tr_t - Ko_t) - Tr_f + Ko_f}{0.58 * \frac{Pl_t}{Pl_f} * \frac{Ko_f}{Ko_t} - 1} - 1 \quad * 100$$

$$0.5 * \left(Tr_f - Ko_f - \frac{\frac{Ko_f}{Ko_t} * (Tr_t - Ko_t) - Tr_f + Ko_f}{0.58 * \frac{Pl_t}{Pl_f} * \frac{Ko_f}{Ko_t} - 1} \right)$$

Die Gleichung zur „korrigierten“ Schwellung wurde zur schnelleren Bearbeitung und Archivierung in das Datenverarbeitungsprogramm Excel® eines PC eingegeben und auf Datenträger gespeichert.

Die hier beschriebene und von U. v. Andrian und J. Peters entwickelte Methode ermöglicht, das Ausmaß des traumatischen Hirnödems über das absolute Gewicht der Ödemflüssigkeit quantitativ zu bestimmen. Darüber hinaus kann der bei der Hemisphärentrennung durch ein Abweichen von der idealen Schnittebene zufällig auftretende Trennfehler mathematisch ermittelt werden. Dieses ermöglicht für jedes Tier die gesonderte Berücksichtigung des individuellen Trennfehlers bei der Berechnung der posttraumatischen Hemisphärenschwellung.

6. Systemischer Blutdruck

Die Kontrolle des systemischen Blutdrucks ist bei der Untersuchung des Hirnödems von großer Bedeutung, weil der arterielle Perfusionsdruck des Gehirns bei offener Blut- Hirschanke die Extravasation von Ödemflüssigkeit wirksam beeinflusst.

Der Blutdruck wurde über einen in die Schwanzarterie eingeführten Katheter gemessen. Dieser war mit einem Druckwandler und Messgerät zur kontinuierlichen Messung verbunden. Die Aufzeichnung des Blutdrucks wurde unmittelbar nach der Präparation des Zugangs begonnen und bis einschließlich 30 Minuten nach Versuchsende weitergeführt. Die Messwerte wurden im 15-minütigen Abstand protokolliert.

7. Körpertemperatur

Die Kerntemperatur der Tiere wurde von Versuchsbeginn an durch eine rektale Sonde gemessen, und über eine rückgekoppelte Heizplatte zwischen 37.5 und 38.5 °C konstant gehalten. Die Messung erfolgte kontinuierlich, die Körpertemperatur wurde in 15-minütigen Abständen protokolliert.

8. Blutgase und Hämatokrit

Arterielle Blutgase und Hämatokrit waren weitere Überwachungsparameter. Den Versuchstieren wurde zu definierten Zeitpunkten (vor und nach Trauma) Blut aus der Schwanzarterie entnommen und in eine Glaskapillare abgefüllt. Die Bestimmung erfolgte mit einem Blutgasanalysegerät, das Ergebnis wurde ausgedruckt und ausgewertet.

9. Plasmakonzentration von LF 160687MS

Die Plasmakonzentration des Pharmakons wurde chromatographisch (HPLC) durch die Firma Laboratoires Fournier (Daix, Frankreich) bestimmt.

10. Statistische Auswertung

Der H- Test nach Kruskal und Wallis wurde zum Vergleich unverbundener Stichproben herangezogen. Für den Paarvergleich unverbundener Stichproben wurde der U- Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet.

Zur Berechnung der statistischen Parameter verwendeten wir die Programme: Sigma Stat.und Sigma Plot. (Jandel Scientific ®)

11. Ausschlusskriterien

Vor Beginn der Versuchsreihe wurden Kriterien für den Ausschluss von Versuchstieren festgelegt.

Präparation:

Die Verletzung der Dura und des Hirngewebes, ebenso wie Blutung durch die Trepanation führten zum Ausschluss.

Kälteläsion:

Abweichungen vom standardisierten Protokoll der Kälteläsion führten ebenfalls zum Ausschluss. Die Qualität der Läsion wurde durch Inspektion nach Induktion der Kälteläsion beurteilt (deutlich sichtbare gleichmäßige Vereisungszone).

Infusion:

Der intravenöse Katheter in der V. jugularis externa wurde für die Infusion des Bradykinin B2-Rezeptorantagonisten LF 160687MS implantiert. Ein verlegter oder dislozierter Katheter hätte die gewünschte kontinuierliche Zufuhr des Antagonisten verhindert. Deshalb wurde nach dem Ende jedes Versuchs durch Sektion des Kadavers der korrekte Sitz und die Durchgängigkeit des Katheters geprüft. Bei Mängeln erfolgte der Ausschluss des Versuchstieres.

Blutdruck:

Wie bereits erwähnt spielt der Blutdruck bei der Extravasation eines Hirnödems eine wichtige Rolle (Klatzo et al., 1958; Go et al., 1974). Als untere Grenze des Autoregulationsbereichs der Durchblutung von Gehirn und Niere wird ein arterieller Mitteldruck von 50-60 mmHg angesehen. Um Artefakte durch arterielle Hypertension zu vermeiden, wurde ein intraoperativer arterieller Mitteldruck von weniger als 60 mmHg als Ausschlusskriterium eines Versuchstieres festgesetzt.

Krankheiten, Anomalien:

Tiere mit sichtbaren Anomalien oder Erkrankungen wurden bereits vor Beginn der Versuche ausgeschlossen.

Tod des Versuchstieres:

Intraoperativ oder postoperativ verstorbene Tiere wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Insgesamt mussten 27 in den Versuch genommene Tiere ausgeschlossen werden:

- 5 Tiere aufgrund eines dislozierten Injektionskatheters.
- 22 Tiere wegen eines zu großen Fehlers bei der Hemisphärentrennung.

III. Ergebnisse

A. Auswirkung auf das Versuchstier

Die Kälteläsion führte zu einer umschriebenen Nekrose, die sich bereits makroskopisch von der intakten Hirnrinde gut abgrenzen ließ. Das Nekroseareal entsprach der zylinderförmigen Spitze der Kältesonde. Der Nekrosedurchmesser betrug 5- 6 mm mit ca. 2- 3 mm Ausdehnung in die Tiefe . Bei der Hirnentnahme nach 24 Stunden wurden weder eine Hämorrhagie oder Anzeichen für eine Wundinfektion beobachtet. Auch in der Beobachtungsphase nach Trauma waren die Tiere unauffällig. Das Aufwachen nach Ausleiten der Narkose dauerte ca. 30 Minuten. Sichtbare neurologische Auffälligkeiten gab es nicht. Die an der Rückenhaut fixierte Spirale für den Schutz des Infusionssystems wurde gut toleriert und behinderte die Tiere kaum in der Bewegung. Nahrungsaufnahme oder Ausscheidung erschienen normal. Auch das Wach- und Schlafverhalten war bei den meisten Tieren unverändert. Allerdings waren einige Tiere apathisch. Wie die Auswertung der Versuche ergab, kam Apathie überproportional häufig bei Tieren mit starker Hemisphärenschwellung vor. Alle Versuchstiere hatten 24 Stunden nach Trauma einen signifikanten ($p < 0.05$) Anstieg des Wassergehaltes der traumatisierten gegenüber der kontralateralen Hemisphäre.

B. Vor- und Nachbehandlung mit LF- 160687MS

Das Gehirn von Ratten (250-300 g Körpergewicht) ohne Kälteläsion hatte ein Gewicht von 1510 ± 100 mg (mean \pm SD; n=10), davon entfielen 762 ± 46 mg auf die linke Hemisphäre und 748 ± 57 mg auf die rechte. Der Wassergehalt der linken Hemisphäre betrug $79.8 \pm 0.7\%$, der der rechten $79.5 \pm 0.7\%$. Nach dem Kältetrauma nahm das Gewicht der exponierten Hemisphäre um durchschnittlich 48mg (6.3%) auf 810 ± 25 mg ($p < 0.01$, n=20) zu. Der Wassergehalt stieg um 1.7% auf $81.5 \pm 0.3\%$ ($p < 0.01$, n=20) an. Gewicht und Wassergehalt der kontralateralen

Kontrollhemisphäre entsprachen mit $768 \pm 27 \text{mg}$ und $80.0 \pm 0.3\%$ den Werten von nicht traumatisierten Versuchstieren. Nach der Korrektur des Trennfehlers ergab sich durch den Einstrom des Hirnödems eine signifikante Gewichtszunahme der exponierten Hemisphäre um $9.3 \pm 1.1\%$ gegenüber der kontralateralen Kontrollhemisphäre ($p < 0.05$) (Abb.11).

Bei Tieren mit Infusion von $100 \mu\text{g/kg/min.}$ (LF 160687MS für 24 Stunden/ Beginn 10 Minuten vor Trauma, $n=10$) wurde - verglichen mit den, mit $0,9\%$ NaCl- Lösung infundierten Kontrolltieren, eine Abschwächung der Hemisphärenschwellung um 20% gefunden. Das heisst, die exponierte Hirnhemisphäre dieser Tiere hatte nach Trauma gegenüber der Kontrollhemisphäre eine Gewichtszunahme um $7.4 \pm 1.3\%$. Diese war statistisch jedoch nicht signifikant. Bei der Versuchsgruppe ($n=11$) mit der niedrigen Dosis ($10 \mu\text{g/kg/min.}$) wurde dagegen eine signifikante Hemmung der Hemisphärenschwellung ($6.4 \pm 1.3\%$; $p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren beobachtet. Das Hirnödem nach Trauma war um 31% gegenüber dem der Kontrollgruppe verringert. Auch der Wassergehalt der linken Hirnhemisphäre war bei den Tieren mit niedriger Dosierung ($10 \mu\text{g/kg/min.}$) gegenüber dem der Kontrollgruppe ($81.5 \pm 0.3\%$) auf $81.3 \pm 0.6\%$ erniedrigt (nicht signifikant). Der Hirnwassergehalt der kontralateralen Hemisphäre von $80.2 \pm 0.5\%$ war gegenüber dem von 80.0 ± 0.3 der Kontrolltiere (ohne Therapie) nicht verändert.

In der Therapiegruppe mit hoher Dosis ($100 \mu\text{g/kg/min.}$) wurde in der linken (exponierten) Traumahemisphäre eine Reduktion des Wassergehalts von $81.5 \pm 0.3\%$ auf 80.8 ± 0.8 (n.s.) gefunden. Die in der anderen Versuchsgruppe festgestellte geringfügige Erhöhung des Wassergehaltes der rechten kontralateralen Hemisphäre (von $79.5 \pm 0.7\%$ bei den Tieren ohne Trauma, bzw. auf $80.8 \pm 0.3\%$ nach Trauma) wurde bei den Tieren mit einer LF- Dosis von $100 \mu\text{g/kg/min.}$ nicht gefunden. Der Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Insult ergab hier $79.6 \pm 0.6\%$ (Abb. 12).

Hemisphärenschwellung 24 h nach Trauma und Vor/ Nachbehandlung mit LF-16 0687 (10 und 100 µg/kg/min)

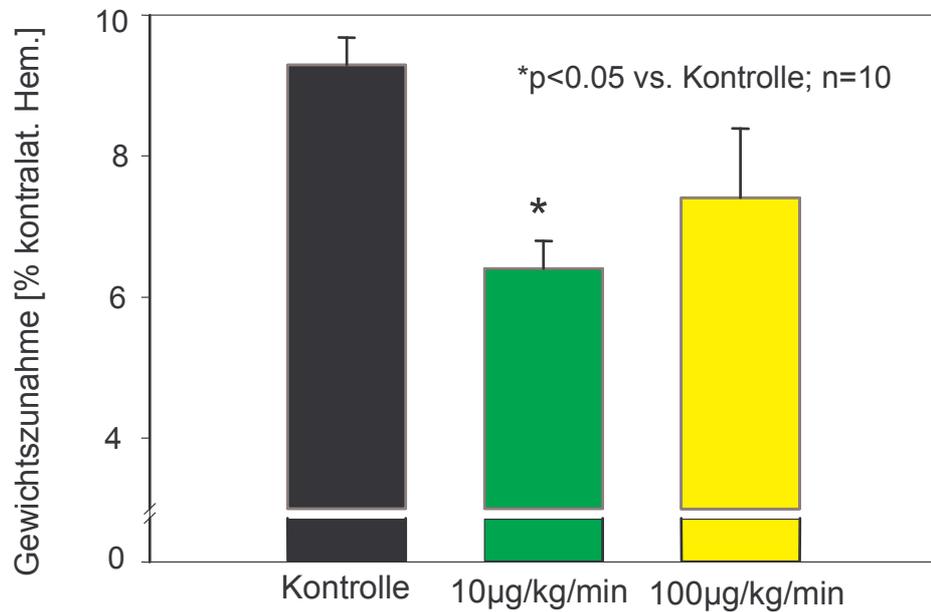


Abb.11:

Bei den Tieren der Kontrollgruppe (Trauma, ohne Therapie) wurde ein Gewichtsanstieg der exponierten Hirnhemisphäre einem Plus von 9,3% gegenüber der kontralateralen Kontrollhemisphäre beobachtet.

Die Applikation der niedrigen Dosierung von 10µg/kg/min ging mit einer statistisch signifikanten Abschwächung der Hemisphärenschwellung nach Insult einher.

Die hohe LF 160687MS Dosis von (100µg/kg/min) bewirkte ebenfalls eine therapeutische Abschwächung - jedoch ohne statistische Signifikanz gegenüber der Hemisphärenschwellung der Versuchstiere ohne Therapie.

Hemisphärenwassergehalt 24 h nach Trauma und Vor/ Nachbehandlung mit LF-16 0687 (10 und 100 µg/kg/min)

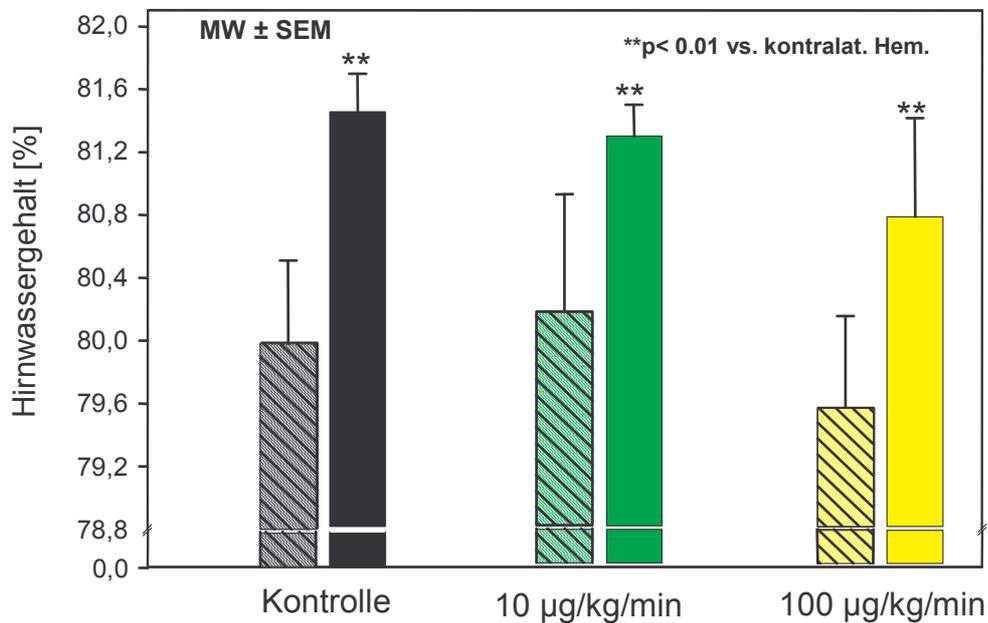


Abb.12: Wassergehalt der Hirnhemisphären von Tieren aller Versuchsgruppen

Die mit NaCl infundierten Kontrolltiere mit Insult hatten im Vergleich zur kontralateralen Kontrollhemisphäre einen signifikanten Anstieg des Hirnwassergehalts der exponierten Hirnhemisphäre. Dieser durch das Trauma hervorgerufene Anstieg des Wassergehalts wurde durch den Rezeptorantagonisten (10 bzw. 100 µg/kg/min) nicht signifikant beeinflusst.

Bei den mit NaCl infundierten Versuchstiere wurde ein Anstieg der traumatisierten Hemisphären von 80,0% (kontralaterale Kontrollseite) auf 81,4% gefunden.

In der Versuchsgruppe mit niedriger LF-dosis war der Hirnwassergehalt der Hemisphären mit Trauma auf 81,3% gegenüber 80,1% der Kontrollseite angestiegen.

1. Systemische Kontrollparameter

Der arterielle Blutdruck spielt für die Extravasation eines Hirnödems bei geschädigter Blut-Hirnschranke eine entscheidende Rolle und ist somit ein wichtiger Kontrollparameter. Der Blutdruck wurde kontinuierlich in einer Zeitspanne von 30 Minuten vor bis einschließlich 30 Minuten nach Trauma gemessen (Abb. 13). Weder bei den Kontrolltieren mit Infusion von NaCl- Lösung (ohne Therapie) noch bei den mit LF 160687MS behandelten Versuchstieren wurden nennenswerte Blutdruckveränderungen beobachtet.

Gleiches gilt prinzipiell für den arteriellen pH, der weder 30 Minuten vor, noch 30 Minuten nach Trauma Abweichungen von der physiologischen Norm ergab. Auch zwischen den Versuchsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede des arteriellen pH festgestellt (Abb. 14). Entsprechendes kann über die arteriellen Blutgase, den Hämatokrit und die Hämoglobinkonzentration gesagt werden. Der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck zeigte gleichfalls keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 1). Die Bestimmung der Körpertemperatur ergab einen konstanten Verlauf. Zwischen den Versuchsgruppen wurden keine Unterschiede beobachtet (Tabelle 1).

Weiterhin musste kein Versuchstier aufgrund von Zwischenfällen, z. B. bei der Narkoseeinleitung, Induktion der Läsion oder wegen vorzeitigem Ableben ausgeschlossen werden.

Die Tiere aller Versuchsgruppen hatten während des Versuchs einen Körpergewichtsverlust von ca. 10%.

Arterieller Blutdruck bei Vor/ Nachbehandlung mit LF-16 0687 (10 und 100 µg/kg/min)

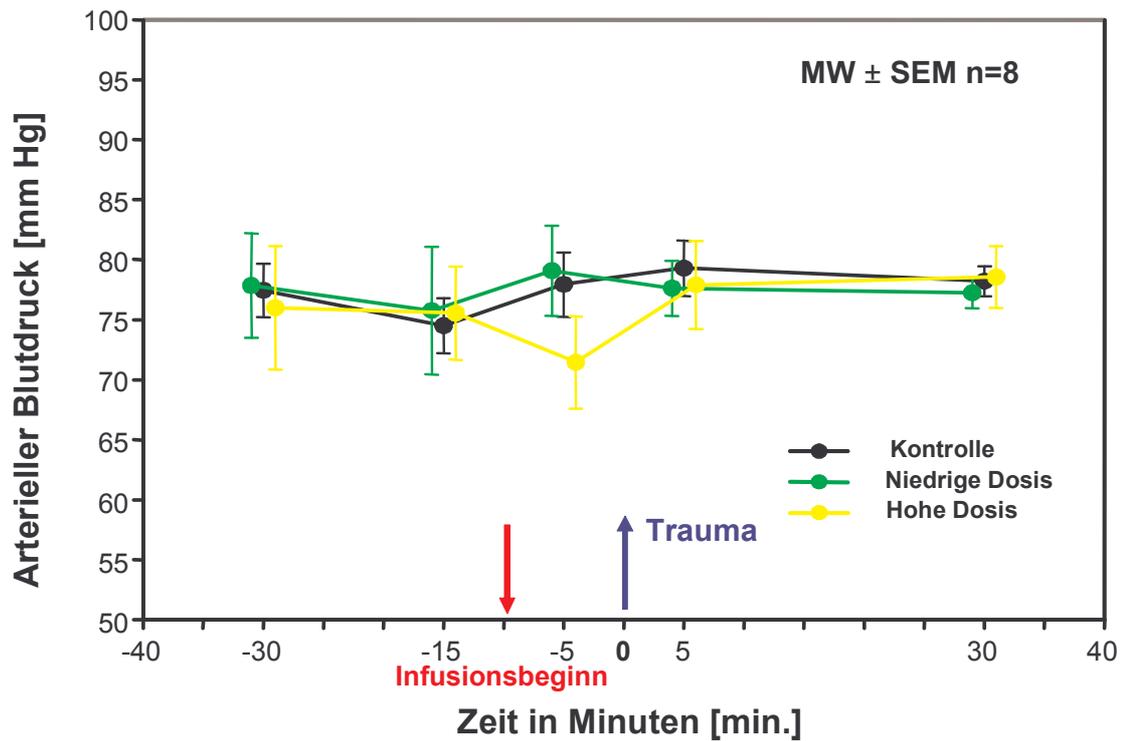


Abb.13:

Der kontinuierlich von Operationsbeginn bis einschließlich 30 min. nach Trauma gemessene arterielle Blutdruck wurde weder durch das fokale Trauma des Gehirns noch durch die Medikation beeinflusst.

Art. pH vor und nach Trauma bei Vor/ Nachbehandlung
mit LF-16 0687 (10 und 100 µg/kg/min)

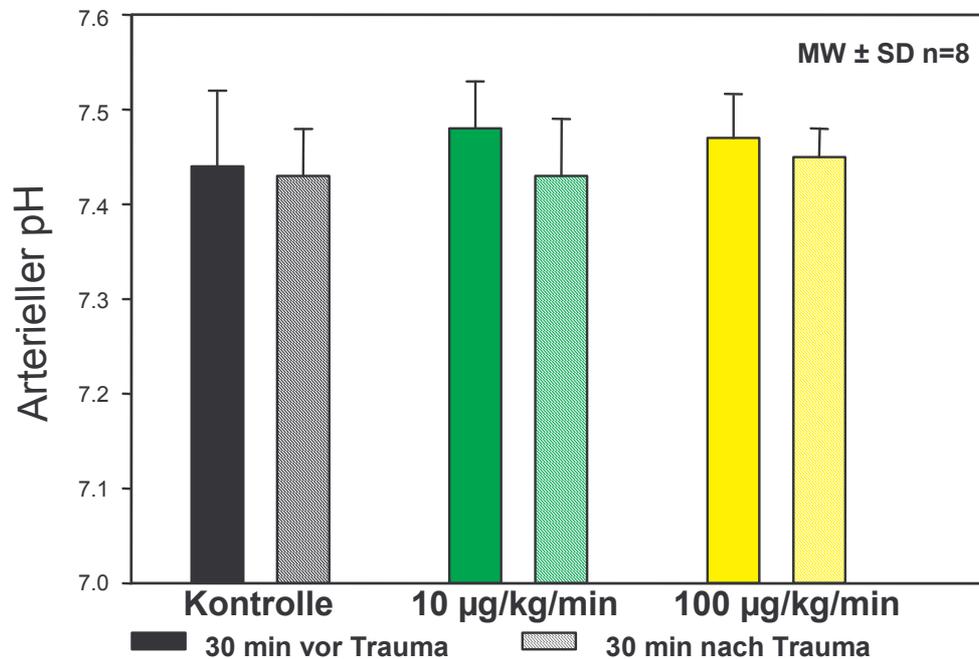


Abb.14:

Der arterielle pH wurde 30 min. vor sowie 30 min. nach Trauma bestimmt.

Die Säulendiagramme symbolisieren die zugehörigen Ergebnisse der Versuchsgruppen.

Die jeweils dunkleren Säulen symbolisieren den pH der Tiere der Versuchsgruppen 30 min. vor Trauma, die helleren den pH 30 min. nach Trauma.

Der art. pH bewegte sich in einem Bereich von 7.4 bis 7.45.

Physiologische Parameter	Gruppe	vor Trauma 30min.	nach Trauma 30min.
pO ₂ [mmHg]	Kontrolle	98±15	98±12
	niedrige Dosis 10 µg/kg/Min.	104±13	101±18
	hohe Dosis 100 µg/kg/min	10±622	101±20
pCO ₂ [mmHg]	Kontrolle	34.8±3.0	36.0±1.6
	niedrige Dosis 10 µg/kg/Min.	34.1±4.9	33.1±3.3
	hohe Dosis 100 µg/kg/min	34.0±2.6	33.6±3.8
Körpertemperatur rektal [°C]	Kontrolle	39.9±0.6	36.9±0.7
	niedrige Dosis 10 µg/kg/Min.	36.8±0.5	36.8±0.6
	hohe Dosis 100 µg/kg/min	36.3±0.8	36.9±0.7
Blutzucker [mg/ml]	Kontrolle	182±44	-
	niedrige Dosis 10 µg/kg/Min.	178±46	-
	hohe Dosis 100 µg/kg/min	201±55	-
Körpergewicht [g]	Kontrolle	303±18	271±19
	niedrige Dosis 10 µg/kg/Min.	295±22	265±31
	hohe Dosis 100 µg/kg/min	329±35	296±22

Tabelle1:

Physiologische Parameter (MW±SD) der Versuchstiere mit Vor- und Nachbehandlung mit LF 160687MS.

Die Therapie mit niedriger und hoher LF-Dosis hatte keine Auswirkungen auf die hier untersuchten Kontrollgrößen.

2. Serumkonzentration von LF 160687MS

Am Ende des Versuchs (24 Std. nach Trauma) wurde den Tieren eine Blutprobe aus dem rechten Ventrikel entnommen, um die Serumkonzentration von LF 160687MS zu ermitteln. Erwartungsgemäß konnte bei den Kontrolltieren (ohne Therapie) kein Rezeptorantagonist im Blut nachgewiesen werden.

Bei den Tieren der Therapiegruppen mit 10 bzw. 100 µg/kg/min. LF 160687MS wurde eine Plasmakonzentration (Mittelwert± SEM) von 30± 5ng/ml in der Niedrigdosis- bzw. 714±205 ng/ml in der Hochdosistherapiegruppe gefunden (Abb. 15).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Applikation des selektiven B2-Rezeptorantagonisten LF 160687MS die Entwicklung des posttraumatischen Hirnödems signifikant abschwächt, wenn sie 10 Minuten vor Trauma begonnen und über 24 Stunden weitergeführt wird.

3. Schlussfolgerung

Nachdem die Experimente eine grundsätzliche therapeutische Wirksamkeit der Vorbehandlung mit LF 160687MS auf das vasogene Hirnödem nach Trauma gezeigt haben (proof of principle), sollten weitere Versuche dessen Wirksamkeit unter klinisch relevanten Bedingungen i. e. bei Therapiebeginn nach Trauma prüfen. Für diesen Zweck wurde mit der Infusion des Rezeptorantagonisten 30 oder 60 Minuten nach Insult begonnen.

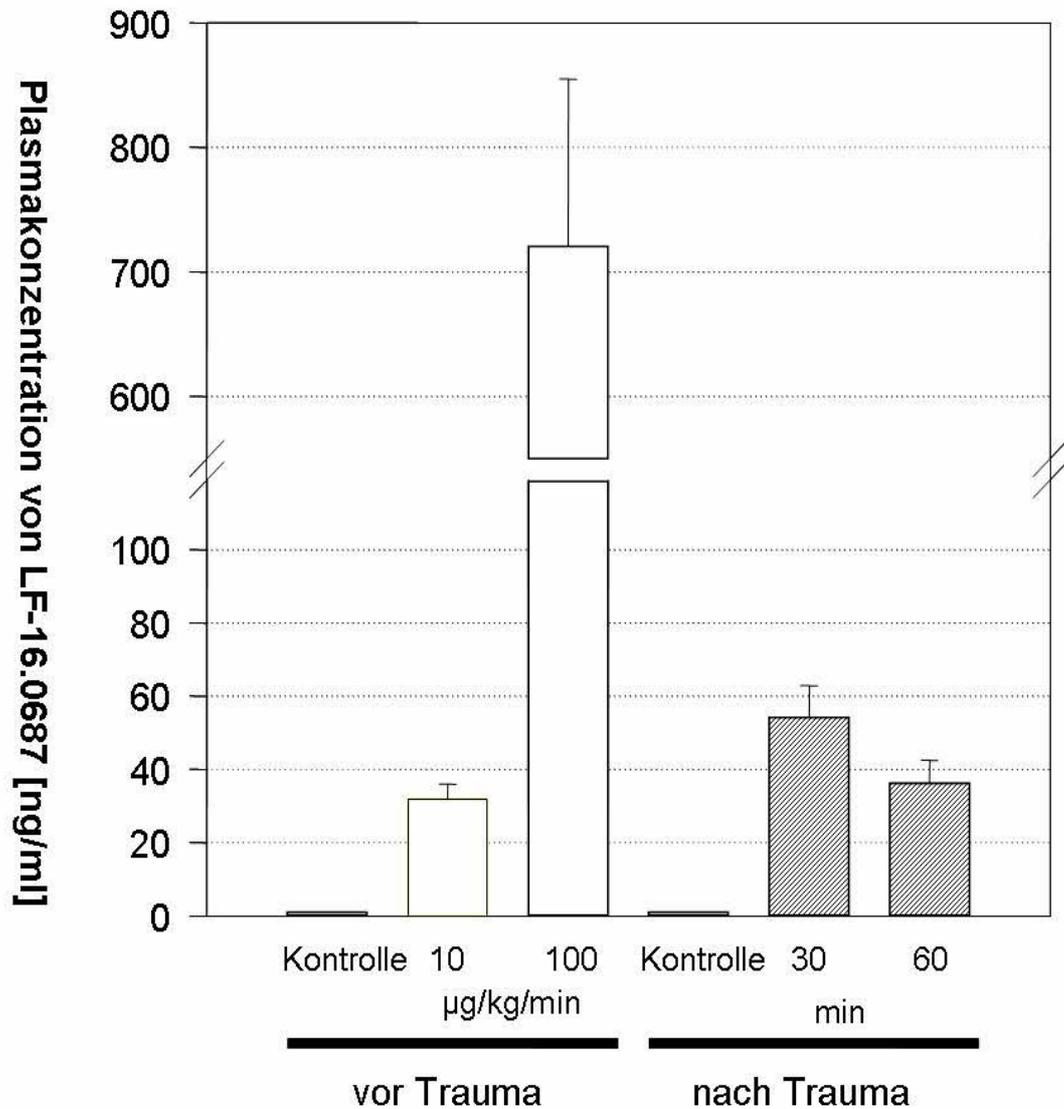


Abb15.:

Serumspiegel der mit LF 160687MS behandelten Versuchstiere 24h nach Trauma. Erwartungsgemäß hatten die unbehandelten Kontrolltiere keinen Rezeptorantagonisten im Plasma. Bei den Therapiegruppen (10 bzw 100 µg/kg/min LF 160687MS) wurde Plasmakonzentration (Mittelwert± SEM) von 30± 5ng/ml in der Niedrigdosis- bzw. 714±205 ng/ml in der Hochdosisgruppe nachgewiesen (Abb.15).

C. Nachbehandlung mit LF 160687MS

Für diese Experimente wurden die Versuchstiere randomisiert drei Versuchsgruppen zugeteilt. Die Therapiegruppen (jeweils n=10) erhielten LF 160687MS in 10 µg/kg/min., d.h. die in den Vorversuchen wirksamste Dosierung.

Die Tiere der Kontrollgruppe (n=10) wurden mit NaCl- Lösung infundiert. Der Therapiebeginn war 30 bzw. 60 Minuten nach Trauma. Weitere Protokolländerungen gab es nicht. Das Ausmaß der Hemisphärenschwellung nach Insult erreichte bei den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe $+8.2\pm 1.5\%$, es entspricht den Ergebnissen bei den unbehandelten Tieren (i. e. $9.3\pm 1.1\%$) des ersten Versuchabschnittes mit LF160687MS Vorbehandlung. Der Wassergehalt der linken Hirnhemisphäre stieg bei nicht behandelten, traumatisierten Kontrolltieren von $79.8\pm 0.7\%$ auf $81.7\pm 0.3\%$ an. Die kontralaterale Hirnhemisphäre hatte eine Zunahme des Wassergehaltes von $79.5\pm 0.7\%$ auf $80.5\pm 0.4\%$.

Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit LF160687MS wurde die Entwicklung des traumatischen Hirnödems bei den Tieren mit Therapiebeginn 30 bzw. 60 Minuten nach Läsion nicht gehemmt. Die Schwellung der linken Hirnhemisphäre lag bei $9.3\pm 2.2\%$ bei den Tieren mit Therapiebeginn 30 Minuten nach Insult und bei $10.4\pm 1.8\%$ bei Tieren mit Therapiebeginn 60 min. nach Trauma (Abb. 16). Auch der Wassergehalt der Hirnhemisphären der Tiere mit Therapiebeginn nach Insult war gegenüber dem erhöhten Hirnwassergehalt der unbehandelten Kontrolltiere nicht signifikant verändert (Abb. 17).

1. Systemische Kontrollparameter

Die physiologischen Kontrollparameter blieben wie in den Versuchen mit Therapie vor Trauma im Normbereich. Auch zwischen den Versuchsgruppen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden (Abb. 18, 19, Tab. 2).

Hemisphärenschwellung 24 h nach Trauma und Nachbehandlung mit LF-16 0687

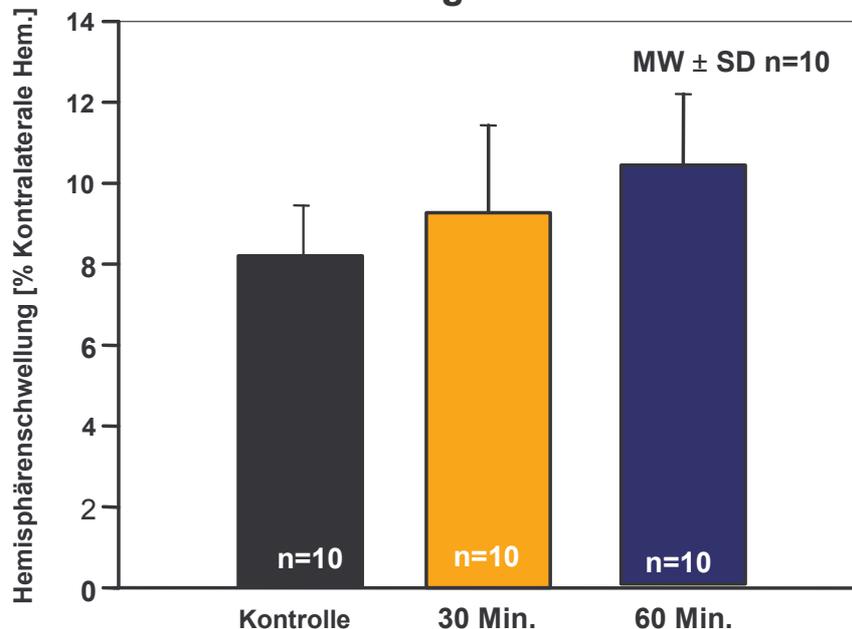


Abb.16:

Schwellung (Gewichtszunahme in Prozent der kontralat. Hemisphäre) der exponierten Hemisphäre 24h nach Trauma

Die Tiere mit Therapiebeginn 30 min. nach Insult hatten eine Gewichtszunahme der traumatisierten Hemisphäre von 9.3 % gegenüber 8.2% der unbehandelten Tieren mit Insult. Bei Therapiebeginn 60 min. nach Trauma war das Hemisphärenengewicht auf 10.4 % gegenüber dem der unbehandelten Kontrolltieren angestiegen. Die Schwellungszunahme hatte jedoch keine statistische Signifikanz.

Hemisphärenwassergehalt 24 h nach Trauma und Nachbehandlung mit LF-16 0687

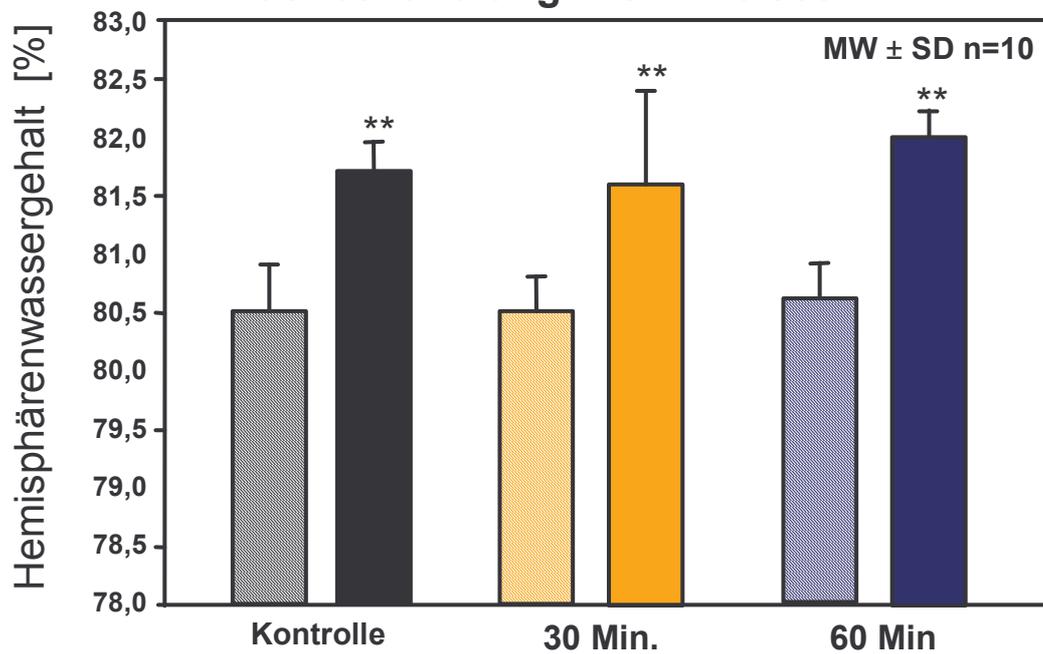


Abb.17:

Bei den Versuchsgruppen mit Beginn der Behandlung mit 10 µg/ kg/ LF- 16 0687MS nach Trauma zeigte keinen Unterschied zwischen dem Wassergehalt der traumatisierten Hemisphären der Therapie- und dem der Kontrollgruppe.

Arterieller Blutdruck vor und nach Trauma bei Versuchstieren mit LF-16 0687-Nachbehandlung

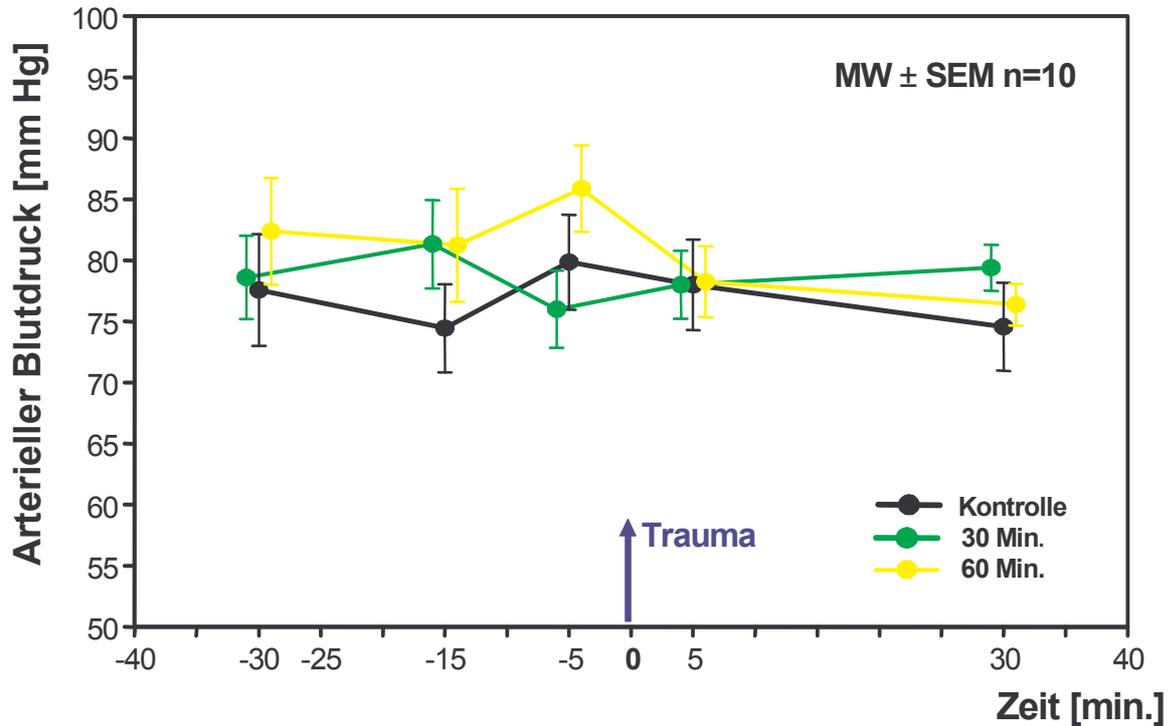


Abb.18:

Auch in dieser Versuchsserie wurde eine kontinuierliche Kontrolle des art. Blutdrucks durchgeführt. Die Messung begann nach Einleitung der Narkose und Implantation eines Katheters in die Schwanzarterie bei Versuchsbeginn und endete 30min. nach Trauma. Weder während der Präparation, der Applikation der Kälteläsion noch in der posttraumatischen Phase kam es zu signifikanten Schwankungen des Blutdrucks.

Art. pH vor und nach Trauma bei Versuchstieren mit LF-16 0687- Nachbehandlung

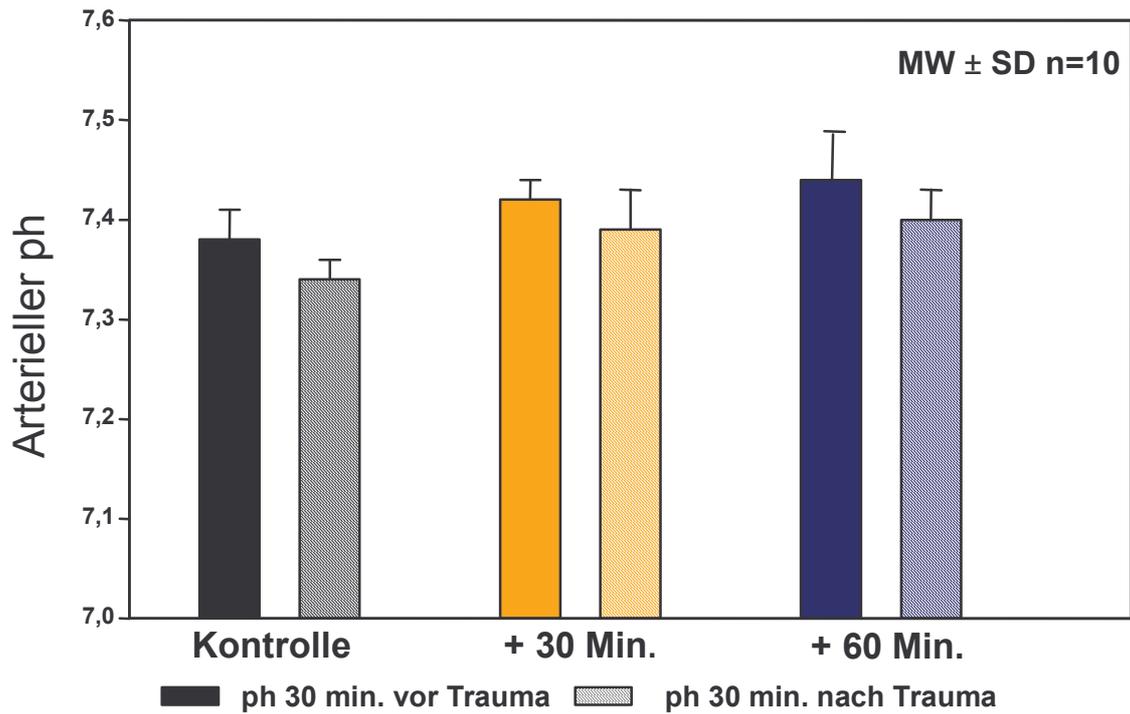


Abb.19:

Die Graphik zeigt den 30min. vor bzw. 30min. nach Trauma gemessenen arteriellen pH.

Wie in der vorangegangenen Versuchsreihe wurden auch hier keine durch den Versuch ausgelösten Schwankungen beim arteriellen pH beobachtet.

Physiologische Parameter	Gruppe	vor Trauma 30min.	nach Trauma 30min.
pO₂ [mmHg]	Kontrolle	101±15	100±12
	30min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	108±23	104±17
	60min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	104±31	100±15
pCO₂ [mmHg]	Kontrolle	37.3±1.2	41.4±2.5
	30min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	36.1±2.0	39±2.3
	60min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	36.7±1.1	40.3±2.2
Körpertemperatur rektal [°C]	Kontrolle	37.1±0.3	37.1±0.4
	30min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	36.9±0.3	37.0±0.3
	60min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	36.7±0.2	36.9±0.3
Blutzucker [mg/ml]	Kontrolle	198±44	-
	30min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	232±42	-
	60min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	226±41	-
Körpergewicht [g]	Kontrolle	344±19	316±20
	30min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	320±31	291±28
	60min. nach Trauma 10 µg/kg/Min.	314±23	283±24

Tabelle2: Physiologische Kontrollparameter (MW±SD) von Versuchstieren vor und nach Insult bei Nachbehandlung mit und ohne LF 160687MS

IV. Diskussion

A. Wahl der Versuchstiere

Die Ratte ist ein in der biomedizinischen Forschung etabliertes, und auch in unserer Arbeitsgruppe häufig verwendetes und geeignetes Versuchstier. Die eigenen Erfahrungen tragen dazu bei, das Vorkommen von Komplikationen während des Versuchs gering zu halten. Die Ratte eignet sich für unsere Fragestellung aufgrund folgender Überlegungen:

1. Körpergröße bzw. Gewicht erlauben, dass die Versuchsdurchführung sowie Narkosepräparation und Überwachung von nur einer Person ohne weitere Hilfestellung bewältigt werden kann. Ratten können problemlos intubiert und narkotisiert werden, die gravimetrische Ermittlung der Hemisphärenschwellung ist zuverlässig durchführbar.
2. Die Herzkreislauffunktion von gesunden Tieren gewährleistet eine unkomplizierte Narkose ohne größere Blutdruckschwankungen.
3. Durch die Kälteläsion des Gehirns kommt es bei Ratten im Gegensatz zu anderen Versuchstieren (z. B. Kaninchen) nicht zur hämorrhagischen Kolliquationsnekrose. Diese würde die gravimetrische Bestimmung der Hirnschwellung verfälschen.
4. Die durch die von U. v. Andrian und J. Peters entwickelte Korrekturformel zur Eliminierung des Fehlers bei der Hemisphärentrennung ermöglicht es, Tiere mit geringen Hirngewichten zu verwenden.
5. Die Größe der Ratte erlaubt Dauerinfusionen beim wachen Tier mit erhaltener Bewegungsfreiheit, wodurch dessen Belastung reduziert wird.
6. Ratten wie Menschen haben Bradykinin B₂- Rezeptoren (Hall 1992), die wichtigste Voraussetzung für die vorliegenden Versuche.

7. Bei Ratten und bei anderen kleinen Versuchstieren ist es leichter möglich Inzuchtstämme mit geringerer genetischer Variabilität zu verwenden. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse verbessert.
8. Ratten werden im Gegensatz zu Haustieren wie Katze oder Hund als Versuchstier besser akzeptiert. Dieser Aspekt spielt in der Auseinandersetzung mit Tierversuchen eine wichtige Rolle.

B. Die fokale Kälteläsion des Gehirns

Die von Clasen et al. (1953) und Klatzo et al. (1958) erstmals beschriebene fokale Kälteläsion des Gehirns ist als bewährtes Versuchsmodell zur Erzeugung eines vasogenen Hirnödems experimentell anerkannt. Durch kurzfristige Vereisung der exponierten Hemisphäre wird dem Gewebe durch Eiskristallbildung Wasser entzogen. Durch diesen Prozess wird die Solutkonzentration der Zelle stark erhöht. Bei Wiedererwärmung mit Auftauen des Gewebes kommt es zu einem massiven osmotischen Wassereinstrom und damit zur Zerreißung der zellulären Membranen mit Untergang von betroffenen Endothel-, Glia- und Nervenzellen (Meryman 1956). Aus dem nekrotischen Gewebe werden Mediatorsubstanzen freigesetzt, welche die Funktionsstörung der Bluthirnschranke verstärken (Baethmann 1989). Ein wirksamer Mediator ist das nach Aktivierung des Kallikrein- Kinin Systems freigesetzte Bradykinin (Maier-Hauff 1984; Unterberg 1984; 1986). Die Folge der massiven Schrankenschädigung ist u.a. der Austritt von eiweißreichem Plasmaexudat (unter Mitnahme von Salzen und Wasser) in das Interstitium des Gehirns- die Extravasation des vasogenen Hirnödems. Dieses Ödem ist im weiteren Verlauf durch eine Flüssigkeitsverlagerung („bulk flow“) entlang eines hydrostatischen Druckgradienten vom Ort des Eintritts in die weiße Substanz des Gehirns gekennzeichnet (Reulen 1977, 1977, 1978). Das vasogene Hirnödem erhöht den cerebralen Wasser- und Natriumgehalt bei Absinken des Kaliumgehaltes (Pappius, Gulati, 1962). Durch das Ödem

bedingte Raumforderungen sind Ursache der intrakraniellen Volumenzunahme. Wegen der starren Begrenzung des Gehirns durch den knöchernen Schädel werden in Abhängigkeit von der Raumforderung die intrakraniellen Reserveräume - vor allem das Liquorkompartiment - verbraucht. Der intrakranielle Complianceverlust sinkt als Voraussetzung für den Anstieg des intrakraniellen Drucks. Eine gefürchtete Konsequenz ist die Verminderung der Hirndurchblutung und die Herniation des Gehirns in den Tentoriumschlitz oder das Foramen magnum. Beides sind Komplikationen, die mit dem Überleben nicht mehr vereinbar sind.

Das Hirnödem ist von einer Vielzahl pathophysiologischer Mechanismen begleitet. Hierzu gehören Veränderungen des EEG's (Schürer, 1987), histopathologische Veränderungen des Gehirns (Lossinski, 1983; Moore, 1987; Hammersen, 1988) sowie nachhaltige metabolische/biochemische Funktionsstörungen (Pappius, 1987; Handstock, 1988; Choadon, 1989, Baethmann 1980, 1988; Übersicht).

Mit Hilfe der experimentellen Kälteläsion des Gehirns - als Modell eines akuten zerebralen Insults - können viele Einzelheiten des traumatischen Hirnschadens untersucht werden. Unsere Arbeitsgruppe hat mit diesem Modell umfangreiche Erfahrungen gesammelt. Eine Internet Literaturrecherche namhafter Fachzeitschriften hat ergeben, dass viele andere Arbeitsgruppen dieses Verfahren ebenfalls verwenden. Allein in den Jahren 1980-2002 kam die Kälteläsion des Gehirns bei nicht weniger als 326 Untersuchungen zur Anwendung. Bei 178 Untersuchungen wurden Ratten als Versuchstiere verwendet.

Ein wichtiger Vorteil der Kälteläsion gegenüber anderen Läsionsmodellen ist die gute Reproduzierbarkeit des vasogenen Ödems, ohne das weitere – ohne Frage - wichtige Aspekte des Schädel- Hirntraumas wie z.B. intrakranielle Blutungen oder Liquorabflussstörungen mit einbezogen werden müssen. Der diffuse Axonschaden oder der Vasospasmus infolge einer Hirnblutung spielen ebenfalls keine Rolle. Zur Untersuchung dieser Phänomene müssten andere

Versuchsmodelle wie z. B. das *Fluid Percussion-* oder *Controlled Cortical Impact* Modell herangezogen werden.

Das Ziel dieser experimentellen Studie war nicht, ein klinisch umfassend repräsentatives Schädel- Hirntrauma-Modell mit allen Begleiterscheinungen zu untersuchen - ein solches Modell steht gar nicht zur Verfügung - sondern die therapeutische Wirksamkeit von LF 160687MS auf die traumatische Hirnschwellung, und damit die Mediatorfunktion des Kallikrein- Kinin Systems unter standardisierten Bedingungen zu analysieren. Hierzu musste natürlich ein Modell herangezogen werden, bei dem eine Aktivierung des Systems mit Bildung von Bradykinin gesichert ist. Ein Vorteil der Kälteläsion ist weiterhin, daß die Läsion und das entstandene Ödem weitgehend auf eine Hirnhemisphäre begrenzt ist. Die kontralaterale Hirnhemisphäre kann daher als Referenz zur Ermittlung der Hemisphärenschwellung benützt werden.

C. Alternative Modelle

Im Gegensatz zur klinischen Neurotraumatologieforschung, die alle relevanten Aspekte der Hirnschädigung berücksichtigen muß, beschränkt sich die experimentelle Forschung jeweils auf Teilaspekte unter besser standardisierbaren Bedingungen. Daher sind für das Neurotrauma vereinfachende Modelle erforderlich, um interessierende Komponenten unter Ausschaltung von Störfaktoren analysieren zu können.

Den wichtigsten Modelle lassen sich zwei Methoden zuordnen: *Mechanische- und Thermotraumen*. Diese Läsionsmethoden unterscheiden sich nicht nur durch eine unterschiedliche Lokalisation und Modalität des Traumas, sondern auch je nach Fragestellung durch die jeweils induzierten pathologischen Veränderungen des Gehirns.

1. Mechanische Traumen:

Ein häufig verwendetes, gut untersuchtes Modell einer experimentellen Schädel- Hirnverletzung ist die 1966 von Lindgren und Rinder etablierte „Fluid- Percussion“- Methode (Lindgren, Rinder 1966). Der Insult wird bei intakter Dura erzeugt, nachdem ein flüssigkeitsgefüllter Zylinder nach Trepanation des Schädels auf die Dura aufgesetzt worden ist. Das distale Ende des Zylinders ist mit einem Korken verschlossen. Durch Aufprall eines Metallpendels auf den Korken wird ein dosierter Druckimpuls von mehreren Atmosphären erzeugt und auf das exponierte Gehirn weitergeleitet. Dadurch entsteht ein -lediglich „moderates“ Hirnödem, ein vom Schweregrad abhängiger, diffuser Axonschaden mit subarachnoidaler sowie intraparenchymalen Blutungen. Nachteile sind die hohe Mortalität bei höherem Schweregrad des Impulses (durch ausgeprägte Beteiligung des Hirnstamms) sowie die Variabilität und schlechte Reproduzierbarkeit der induzierten, pathologischen Veränderungen (z.B. aufgrund einer unterschiedlichen Gefäßanatomie etc.). Für die eigenen Versuche wäre das Auftreten von Blutungen ein entscheidender Nachteil, da sie das Hirnödem schlechter quantifizierbar machen.

Bei dem „Weight- drop,-“ Modell (Feeney et al., 1981) wird nach Trepanation des stereotaktisch fixierten Schädels ein Gewicht aus definierter Höhe auf die exponierte Dura fallen gelassen. Hierdurch entsteht eine lokal begrenzte hämorrhagische Nekrose von Hirnrinde und weißer Substanz mit nachfolgender Kolliquationsnekrose.

Marmarou hat ebenfalls ein „Weight- drop“ Modell zur Erzeugung eines diffusen traumatischen Hirnschadens entwickelt (Marmarou et al., 1994; Foda et al., 1994). Bei diesem Versuchsaufbau fällt ein Gewicht auf ein, auf die intakte Kalotte aufgelegtes Metallplättchen. Der Kopf des Versuchstiers ist auf Schaumstoff gelagert. Marmarou glaubt, mit diesem Modell die vielfältigen Merkmale eines stumpfen Schädel- Hirntraumas verschiedener Schweregrade reproduzieren zu können.

Beide, die Fluid- Percussion- und die Weight- drop- Methode waren für die eigenen Experimente als Versuchsmodelle ungeeignet, da ein vasogenes Hirnödem damit schlecht reproduzierbar ist. In diesem Zusammenhang ist auch das „Controlled Cortical Impact“- Modell für Kleintiere zu nennen, bei dem der Insult durch einen druckluftbeschleunigten Bolzen appliziert wird (Anderson, 1982; Dixon 1991; Lighthall, 1988). Sein Vorteil ist die exakte Reproduzierbarkeit der Traumamechanik. Dieses Modell schied ebenfalls wegen der o. g. Problematik für die eigenen Versuche aus.

Wenngleich die hier vorgestellten kinetischen Modelle der komplexen Verletzungsmechanik des Gehirns nahe kommen, eignen sie sich nur mit Einschränkung für die Untersuchung der traumatischen Hirnschwellung. Gleichwohl wird immer wieder bezweifelt, ob die fokale Kälteläsion ein relevantes Hirntrauma- Modell ist.

2. Thermische Traumen:

Durch das in den vorliegenden Versuchen verwendete Modell der fokalen Kälteläsion wird ein thermisches Trauma erzeugt. Hierzu gibt es auch eine 1981 von Pappius berichtete Variante, wobei ein auf 80°C erhitzter Stempel der Dura aufgebracht wird (Pappius et al., 1981). Dadurch entsteht erwartungsgemäß ebenfalls eine fokale Nekrose des Hirnparenchyms. Dieses Verfahren fand allerdings, wie eingehende Literaturrecherchen zeigten, keine breite Anwendung. Weil auch in unserer Arbeitsgruppe keine Erfahrungen vorhanden waren, schien die Anwendung für die vorliegenden Experimente nicht sinnvoll.

D. Bradykinin

Kinine wie Bradykinin sind wichtige Mediatoren des sekundären Hirnschadens. Ihre pathophysiologischen Eigenschaften sind seit langem bekannt, wie z. B. ihr stark entzündungs- (Bhoola 1992, Hall 1992) und schmerzinduzierendes Potential (Dray and Perkins 1993). Untersuchungen des Kallikrein- Kinin- Systems haben sich bisher in der Überzahl auf periphere Organe beschränkt. Unsere Arbeitsgruppe gehört zu den ersten, welche die Mediatorfunktion des Kallikrein- Kinin- Systems für den sekundären Hirnschaden nach fokalem Trauma beobachtet und darüber berichtet hat. Das Nonapeptid Bradykinin ist - nach bisher vorliegenden Beobachtungen - für die meisten pathophysiologischen Wirkungen verantwortlich

1 .Bradykininwirkung

a. Peripherie

Eine dominierende Wirkung von Bradykinin ist die Vasodilatation von Widerstandsgefäßen (Frey 1928; Regoli 1980; D'Orleans- Juste 1989). Auch beim Menschen sinkt nach Infusion von Bradykinin der Blutdruck durch eine Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes, gefolgt von Tachykardie und einem erhöhtem Herzminutenvolumen. Die arterielle Hypotension beruht nicht nur auf der Bindung von Bradykinin an den B₂- Rezeptoren der Gefäßmuskulatur, sondern auch auf der Interaktion von B₂- Rezeptoren nach Ligandenbindung mit Endothelzellen. Hier kommt es zur Bildung von NO und durch Aktivierung von Phospholipase A₂ zur Bildung gefäßerweiternder Prostaglandine wie z. B. Prostazyklin und Prostaglandin E₁.

Ein weiterer, durch Bradykinin vermittelter Effekt ist die Zunahme der Permeabilität zerebraler Gefäße (Unterberg 1984; Wahl 1993). Wie durch Histamin könnte an diesen Phänomenen eine Kontraktion von Endothelzellen beteiligt sein (Wahl 1993).

Bradykinin hat auf glatte Muskulatur sowohl eine relaxierende (Rattenuodenum) als auch kontrahierende Wirkung (Rattenuterus, Meerschweinchenileum). Beim Meerschweinchen wurde darüber hinaus eine durch Bradykinin induzierte Bronchokonstriktion festgestellt. In der Niere entfaltet Bradykinin eine diuretische Wirkung.

b. ZNS

Wie bereits erwähnt, sind Eigenschaften und Wirkung des Kallikrein- Kinin Systems zunächst in peripheren Organen und auf den systemischen Kreislauf untersucht worden.

Die Funktion des Kallikrein- Kinin Systems im ZNS blieb hingegen lange unbeachtet. Dieser Rückstand ist inzwischen weitgehend aufgeholt. Die Komponenten des Kallikrein- Kiin Systems sind in vielen Arealen des Gehirns nachgewiesen worden (Chao et al., 1983; Karya et al., 1984; Shisheva et al., 1983). Bradykinin selbst ist in Nervenzellfortsätzen von Hypothalamus und Cortex nachgewiesen worden (Perry und Snyder, 1984). Bradykinin beeinflusst die zerebrale Mikrozirkulation sowohl nach parenchymaler als auch nach intravasaler Applikation (Unterberg 1983).

Nachfolgend werden die wichtigsten Wirkungen von Bradykinin im Gehirn erläutert.

Einfluss auf den Gefäßtonus:

Zahlreiche tierexperimentelle Beobachtungen legen nahe, dass die vasomotorische Bradykininwirkung nicht nur von der Tierspezies, Gehirnregion und dem Versuchsprotokoll abhängig ist. Bei intrakraniellen Arterien von Kaninchen verursacht Bradykinin ohne Vorkontraktion (z.B. durch K^+ -Ionen) eine Vasokonstriktion, während beim Menschen oder bei Katzen Wirkungslosigkeit oder - wie zu erwarten - eine Dilatation berichtet wird (Perry und Snyder, 1984). Nach medikamentöser Vorkontraktion bewirkt Bradykinin durchwegs eine Relaxation von getesteten extraparenchymalen Arterien des Gehirns (Toda, 1977; Wahl et al.,

1983a,b; Whalley und Wahl, 1983a,b; Whalley et al., 1983b, 1987a; Katusic et al., 1986, 1989). Nur bei der Arteria basilaris von Katzen wurde keine Reaktion beobachtet (Whalley und Wahl, 1983a,b). Auch intraparenchymale Arterien des Gehirns reagieren auf Bradykinin mit einer Dilatation (Dacey et al., 1988). Allerdings wird bei der A. basilaris von Kaninchen eine reaktive Kontraktion nach anfänglicher Relaxation gefunden, wenn Bradykinin über 10 Stunden wiederholt appliziert wird (Whalley et al., 1983 a,b).

In situ ist Bradykinin ein potenter Dilator von extraparenchymalen Hirngefäßen. Die perivaskuläre Mikroapplikation von Bradykinin führt bei Piaarterien von Katzen zu einer konzentrationsabhängigen Vasodilatation (Wahl et al., 1983a,b; Whalley und Wahl, 1983a). Eine ähnliche Reaktion wird durch Superfusion des Kortex mit Bradykinin hervorgerufen (Ellis et al., 1987; Kamitani et al., 1985; Kontos et al., 1984, 1990; Myan 1990; Unterberg et al., 1984; Wahl et al., 1985; Yang et al., 1991). Bei Versuchen mit Katzen von Unterberg und Wahl (Unterberg et al., 1984; Wahl et al., 1985) kam es allerdings nach 30-minütiger Superfusion von Bradykinin zur Tachyphylaxie. Ein höheres Alter der Versuchstiere, chronische Hypertonie (Mayhan et al., 1990) sowie das Auftreten von „spreading depression“ (Wahl et al. 1987b) schwächt die Bradykinin induzierte Vasodilatation ab. Die dilatorische Wirkung von Kininen nach Freisetzung aus endogenem Kininogen durch Superfusion der Hirnrinde mit Kallikrein, konnte durch den Kallikreininhibitor Aprotinin gehemmt werden (Kamitani et al., 1985).

In Versuchen mit ventrikulo- ziszernaler Perfusion des Gehirns mit Bradykinin (i. e. durch extraluminale Applikation) wurde ein Anstieg der Hirndurchblutung nachgewiesen und diente als Indiz, dass das Peptid extravaskulär (Unterberg et al., 1983) wirksam ist.

Im Gegensatz dazu wurde durch Infusion von Bradykinin in die A. carotis von Katzen weder eine Kaliberänderung von Piaarteriolen (Unterberg et al., 1984) noch eine Veränderung der Hirndurchblutung beobachtet (Unterberg et al., 1985).

Diese Untersuchungen legen nahe, dass vasomotorisch wirksame Kininrezeptoren der HirngefäÙe extravaskulär lokalisiert sind.

Einfluss auf die Blut- Hirnschrankenfunktion:

Versuche der Arbeitsgruppe um Unterberg (Unterberg et al., 1984) an Katzen haben nach kortikaler Superfusion von Bradykinin eine Extravasation des Blut- Hirnschranken Indikators Na⁺- Fluoreszein (MW 367) aus HirngefäÙen ergeben. Der Austritt des Indikators erfolgte zunächst aus Piavenolen, später auch aus Piaarteriolen, was die bevorzugte permeabilisierende Wirksamkeit von Kininen auf Hirnvenolen erklären könnte (Butt et al., 1990). Indikatoren mit höherem Molekulargewicht wie Fluoreszein - Isothiozyanat - markiertes Dextran (MW 19.400-62.000) oder Albumin (MW 67.000) haben dagegen selbst bei 100fach erhöhter Bradykininkonzentration im Superfusat das GefäÙlumen nicht verlassen (Unterberg et al., 1984). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Bradykinin zu einer selektiven Öffnung der Blut-Hirnhirnschranke für kleine Moleküle führt. Aus dem Molekülradius von Na⁺- Fluoreszein lässt sich ableiten, dass die durch Bradykinin induzierte Blut-Hirnschrankenöffnung wahrscheinlich auf der Eröffnung bestimmter ionensensitiver Kanäle von geeignetem Durchmesser beruht (Unterberg et al., 1984). Bei den hierzu durchgeführten Versuchen mit Katzen wurde durch Exposition des Gehirns mit Bradykinin kein erhöhter Vesikeltransport beobachtet (Unterberg et al., 1987). In anderen Versuchen wurde unter gleichen Bedingungen eine Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration mit Öffnung von tight junctions gefunden (Wiemer et al., 1994). Dieser Befund könnte auf einer Kontraktion von Endothelzellen der betroffenen HirngefäÙe beruhen (Unterberg et al., 1984). Hierzu passen Ergebnisse, dass Bradykinin die Ionenpermeabilität von zerebralen Froschvenolen erhöht (Olesen and Crone, 1986; Olesen, 1987), was ebenfalls auf einer Verkürzung kontraktiler Proteine von Endothelzellen beruhen könnte. Im Gegensatz zur extravasalen Applikation ist die intravaskuläre Bradykiningabe durch unterschiedliche Befunde

charakterisiert. Die Infusion von 10^{-5} M Bradykinin in die A. carotis communis führt zur Extravasation von Meerrettichperoxidase (einem Makromolekül mit einem Molekulargewicht von 40.000 (Raymond et al., 1986)), während die intravenöse Gabe von 10^{-5} bzw. 10^{-6} M Bradykinin von keinem Austritt von Evans Blue aus dem Gefäßbett gefolgt ist (Saria et al., 1983). Nach den 1984 von Unterberg veröffentlichten Versuchen führt die intraarterielle Applikation (A. carotis com.) von Bradykinin zwar zum Austritt des kleinen Moleküls Na^+ -Fluoreszein aus Piagefäßen von Katzen, nicht aber des höhermolekularen Fluoreszein-Isothiozyanat markierten Dextran.

2. Bradykininrezeptoren im Gehirn

Bradykininrezeptoren sind im Gehirn u. a. bei Neuronen des Hirnstammes, der basalen Nuclei des zerebralen Kortex, Thalamus und Hypothalamus sowie bei Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen worden (Raidoo, 1997).

Die pathophysiologisch vermutlich bedeutendsten Rezeptoren haben Hirnarterien, diese sollen daher näher betrachtet werden.

Kininrezeptoren von zerebralen Arterien sind durch Untersuchungen charakterisiert worden, die sich mit der Wirkung von Agonisten und Antagonisten von B1- und B2- Rezeptoren auseinandersetzen. Agonisten wie Methionyl-lysyl-bradykinin oder des-Arg⁹-Bradykinin dilatieren nicht nur große Hirnarterien in vitro (Whalley et al., 1983a; 1987b; Whalley und Wahl, 1983a), sondern auch Arteriolen der Pia mater in situ (Whalley und Wahl, 1983a; Unterberg et al., 1984). Wie Befunde über den B2- Rezeptorantagonisten Thi^{5,8}D- Phe⁷- BK (Whalley et al., 1987b; Ellis et al., 1987) bestätigten, wird diese Wirkung durch den B2- Rezeptor vermittelt. Dieser Antagonist kann im Gegensatz zu dem B1- Antagonisten des- Arg⁹- Leu⁸- Bk (Whalley

und Wahl, 1983a; Unterberg et al., 1984) die gefäßerweiternde Wirkung von Bradykinin aufheben.

Die durch Bradykinin hervorgerufene Dilatation ist endothelzellabhängig (Katusic et al, 1986; Whalley et al., 1987a). Sie kann durch extravaskuläre, nicht aber durch intravaskuläre Applikation von Bradykinin ausgelöst werden (Unterberg et al., 1984). Daraus ist zu folgern, dass der B2- Rezeptor in der abluminalen Plasmamembran von Endothelzellen lokalisiert sein muss.

Im Hinblick auf die Blut- Hirschränkenfunktion sind B1- Agonisten wirkungslos. Ihre Applikation hat weder eine Öffnung, noch eine Inhibition der Bluthirschränkenöffnung zur Folge (Unterberg et al., 1984). Daher ist zu vermuten, dass die Wirkung von Bradykinin auf den Gefäßtonus wie Schrankenpermeabilität von B2- Rezeptoren vermittelt wird, die offenbar intralumenal auch extralumenal lokalisiert sein können.

3. Mediatorfunktion von Bradykinin beim sekundären Hirnschaden

Erste Hinweise für eine Rolle des Kallikrein- Kininsystems als Mediator des sekundären Hirnschadens nach traumatischen Insult lieferten Befunde, daß nach einem experimentellen Schädelhirntrauma signifikante Mengen von Plasmakininogen in das betroffenen Hirngewebe austreten (Meier- Hauff, 1984; Ellis, 1989). Von der im traumatisierten Hirn gefundenen Kininogenmenge wurden ca. 75% durch Umwandlung in Kinine „verbraucht“ (Meier- Hauff, 1984).

In einer Zeitspanne von 24- 48 Stunden nach Trauma kommt es zu einer deutlichen Abschwächung der bradykinininduzierten vaskulären Reagibilität - als Hinweis für eine Veränderung der Expression der vaskulärer Kininrezeptoren durch das Trauma (Görlach, 1998).

Durch Versuche mit verschiedenen Bradykinin- Rezeptoragonisten bzw. Antagonisten (Unterberg, 1986; Stover, 2000; Rachinsky, 2001) konnte die Mediatorfunktion von Bradykinin beim traumatischen sekundärschaden des Gehirns weiter gesichert werden. Bei Patienten mit SHT konnte in einer Phase II- Studie mit dem Rezeptorantagonisten CP-0127 (Bradycor®) eine signifikante therapeutische Wirksamkeit (u.a. durch Senkung des erhöhten intrakraniellen Drucks) sowie eine Verbesserung des Glasgow Coma Score und des treatment intensity level-Indexes nach Marmarou gezeigt werden (Narotam, 1998, Marmarou, 1999).

4. Rolle von Bradykinin bei der Entstehung des Hirnödems:

Die physiologische Funktion des auch im zentralen Nervensystem gefundenen Kallikrein- Kinin- Systems ist noch immer nicht restlos aufgeklärt. Vermutungen sprechen u. a. dafür, daß dieses System an der Produktion von Vorstufen von Nervenzellwachstumsfaktoren und auch an sog. Neuromodulatoren, welche die Transmitter- bzw. Synapsenfunktion beeinflussen beteiligt ist (Bhoola, 1992). Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivierung des Kallikrein- Kininsystems streng kontrolliert. Seine Komponenten (Plasma- und Gewebsskininogene) und die spezifischen Plasma- und Gewebsenzyme (Kallikreine) sind nur als inaktive Vorstufen vorhanden (Bhoola, 1992). Für die Bildung bzw. Freisetzung von Kininen wie Bradykinin bedarf es der enzymatischen Aktivierung der oben genannten Vorstufen. Eine spontane bzw. unkontrollierte Aktivierung des Systems wird durch endogene Inhibitoren (z.B. α_1 - Antitrypsin C1- Esterase, α_2 -Makroglobulin und Antithrombin) unterdrückt (Schachter, 1979). Unter Normalbedingungen ist Bradykinin im Serum nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Es hat eine Halbwertszeit von weniger als 30 Sekunden (Kariya, 1982 b). Sein rascher Abbau erfolgt durch Kininasen (Bhoola, 1992).

Unter akuten pathologischen Bedingungen wie z.B. nach einem Trauma oder einer zerebralen Ischämie kann es jedoch zur massiven Aktivierung des Systems kommen. Der Sekundärschaden des Gehirns nach Trauma oder Ischämie wird ohne Frage durch die Aktivierung des Kallikrein-Kininsystems verstärkt. Unter diesen Bedingungen kommt es zur signifikanten Beschleunigung der Bradykininsynthese aus den inaktiven Kininogenvorstufen.

Mittlerweile ist gesichert, dass viele durch Bradykinin erzeugte pathologische Wirkmechanismen über dessen Bindung an B₂- Rezeptoren vermittelt werden. Die Ligandenbindung dieser an ein G- Protein gekoppelten Rezeptoren bedingt die zur Aktivierung von *intrazellulären second messenger Systemen*, die zur intrazellulären Mobilisierung und Freisetzung von CA²⁺- Ionen mit anhaltender Aktivierung von Phospholipase A₂ und C sowie zur Produktion von NO führen (Bhoola, 1992). Phospholipase A₂ fördert ihrerseits die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen, die als Mediatoren am posttraumatischen Sekundärschaden beteiligt sind.

Die Funktion von Bradykinin als Mediator des vasogenen Hirnödems ist ebenfalls geklärt. Die Verstärkung der Blut- Hirschränke Störung nach einem Insult (z. B. Trauma) durch Bradykinin gemeinsam mit einer arteriellen Vasodilatation und venösen Konstriktion (Wahl, 1988) liefert die pathophysiologische Voraussetzung für die Extravasation des vasogenen Hirnödems in das Hirnparenchym (Unterberg, 1984, 1986, Maier- Hauff, 1984, Klatzo, 1978). Eine erste Bestätigung lieferten Experimente von Unterberg und Baethmann (1984), wonach die ventrikulo- zisternale Perfusion des intakten Gehirns mit 2.5×10^{-6} M Bradykinin (gelöst in künstlichem Liquor) eine signifikante Erhöhung des Hirnwassergehaltes hervorruft.

Die Arbeitsgruppe hat Kriterien definiert, die ein Faktor wie Bradykinin erfüllen muss, um als Mediator des zerebralen Sekundärschadens bewertet zu werden:

a) Seine zerebrale Applikation unter Umgehung der Blut- Hirschränke muss pathophysiologische Folgen haben (z. B. die Eröffnung der Blut- Hirschränke).

b) Zerebrale Insult müssen mit der Bildung bzw. Freisetzung des Faktors im geschädigten Hirngewebe einhergehen,

c) die Hemmung der Bildung bzw. Freisetzung des Faktors ebenso wie dessen pathologische Funktion z. B. durch Rezeptorblockade muss den sekundären Hirnschaden hemmen oder zumindest abschwächen.

Weitere Experimente der Arbeitsgruppe zur Prüfung der anderen oben genannten Kriterien (Vorkommen des Mediators im Gehirn, Abschwächung des Hirnödems nach Trauma) durch Hemmung des Kallikrein- Kinin System liegen ebenfalls vor.

5. Therapeutische Funktion von Bradykinin- Rezeptorantagonisten beim traumatischen Hirnschaden:

Die Hemmung des aktivierten Enzyms Kallikrein durch SBTI (Sojabohnen Trypsin Inhibitor) oder Aprotinin ergab bei Kaninchen eine effektive Abschwächung des traumatischen Hirnödems nach Kälteläsion des Gehirns (Unterberg et al., 1986). Die pathophysiologisch relevante Vasodilatation als Folge der Aktivierung des Kallikrein- Kininsystems beim experimentellen Hirntrauma durch Fluid Percussion kann durch Bradykinin B2- Rezeptorblockade ebenfalls verringert werden (Ellis et al., 1988). Eine randomisierte klinische Studie an 20 Patienten mit Schädelhirntrauma mit 7-tägiger Infusion des B2- Rezeptorantagonisten CP- 0127 ergab eine signifikante Abschwächung der intrakraniellen Hypertension und eine Verbesserung der Glasgow Outcome Scale (Narotam et al., 1995). Eine in den USA mit dem Bradykinin- B2- Rezeptorantagonisten Bradycor® durchgeführte Multicenterstudie (n=139) bei Patienten mit schwerem Schädel- Hirntrauma verlief ebenfalls erfolgreich. Bei den mit Bradycor behandelten Patienten war der Anstieg des intrakraniellen Drucks erheblich geringer ausgeprägt. Die

Therapiegruppe hatte außerdem eine geringere Sterblichkeit als die Placebogruppe (Marmarou et al., 1999).

E. LF 160687MS:

1. Pharmakologie:

Bis vor kurzem standen nur Peptide - mit beschränkter Lebensdauer und anderen Problemen - als Inhibitoren von Bradykininrezeptoren zur Verfügung. FR16 7344 und FR17 3657 waren die ersten selektiv wirksamen Nicht- Peptid- B2- Rezeptorantagonisten (Aramori et al., 1997; Asano et al., 1997). Es stellte sich jedoch heraus, dass das inhibitorische Potential dieser Antagonisten ausgeprägte, Spezies- abhängige Unterschiede aufwies. Ihre Affinität zum B2- Rezeptor von Meerschweinchen war 10mal höher als bei Menschen (Aramori et al., 1997; Asano et al., 1997). Die Arbeitsgruppe von Pruneau hat einen neuen Nicht- Peptid- B2- Rezeptorantagonisten LF 16035C (1-[[3-[2,4-dimethylquinolin-8-yl]oxymethyl]-2,4dichloro-phenyl]sulfonyl]-2(S)-[[4-[4-(aminoiminomethyl)-phenyl]carbonyl]piperazin-1-yl]carbonyl]pyrrolidin,2HCL) mit hoher Affinität für den humanen B2- Rezeptor synthetisiert (Pruneau et al., 1998). Die Wirksamkeit auf den B2- Rezeptor von Ratten und Meerschweinchen wurden ebenfalls in vitro und vivo getestet (Pruneau et al., 1999). Dabei zeigte sich eine nahezu gleiche Affinität wie für den humanen B2- Rezeptor.

LF 160687MS ist der Wirkstoff, mit dem die vorliegenden Experimente durchgeführt worden sind. Es handelt sich ebenfalls um einen Nichtpeptid B2- Rezeptorantagonisten mit folgender Strukturformel (1-[[[(2,4-dichloro-3-[[2,4-dimethylquinolin-8-yl]oxyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)-phenyl]carbonylamino]prophyl]-2(S)-pyrrolidincarboxamid (Abb.20). Dessen Wirkung und Selektivität ist in vielen Experimenten geprüft worden. Dabei stellte sich heraus, dass LF160687MS derzeit der wirksamste B2- Rezeptorantagonist beim Menschen ist (Pruneau et al., 1999).

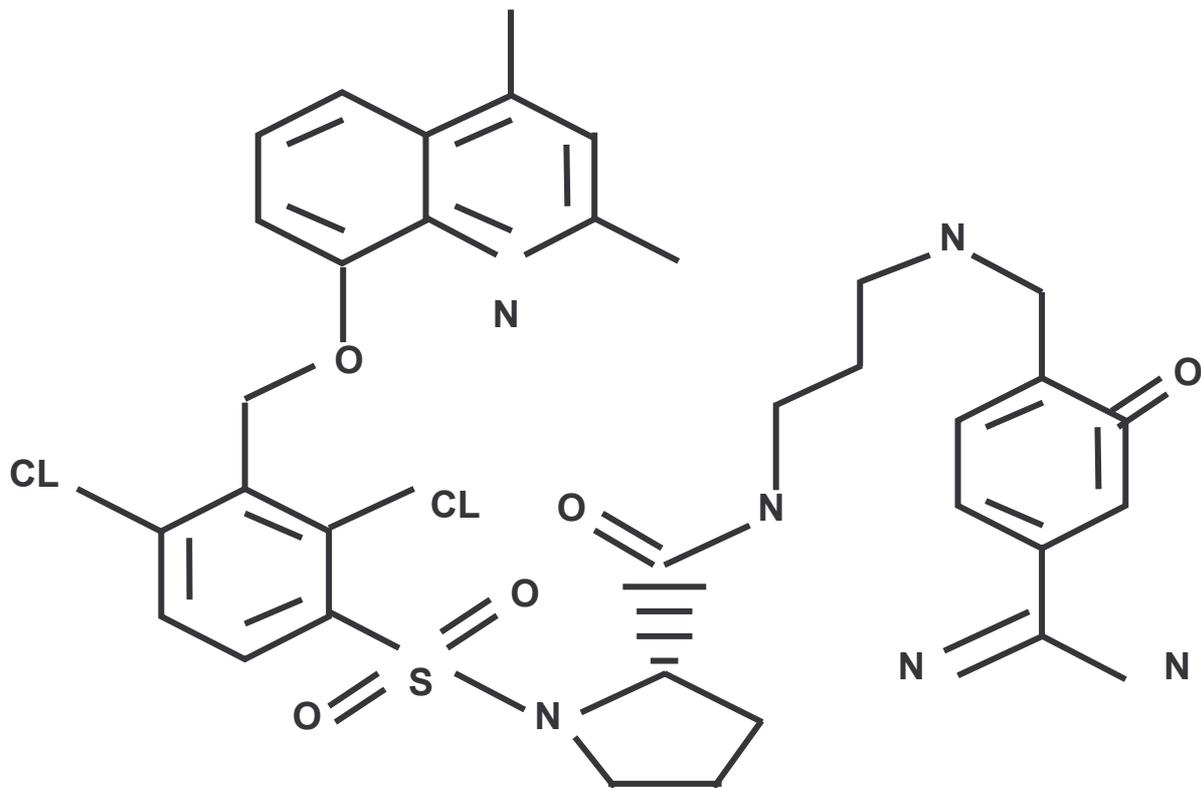


Abb. 20: Strukturformel von LF 160687MS

LF 160687MS ist der Wirkstoff, mit dem diese Experimente durchgeführt worden sind. Es handelt sich ebenfalls um einen Nichtpeptid B₂-Rezeptorantagonisten mit folgender Struktur (1-[[[(2,4-dichloro-3-[[2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)-phenyl]carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidiecarboxamid.

2. Versuche in vitro und an isolierten Organen:

Kompetitive Bindungsstudien mit [³H] Bradykinin haben ergeben, dass LF 160687MS an den (von CHO- Zellen exprimierten) rekombinanten B₂- Rezeptor von Mensch, Ratte und Meerschweinchen gebunden wird (Pruneau et al., 1995; 1998a; 1999; Paquet et al., 1999). Gleiches gilt für native B₂- Rezeptoren menschlichen Umbilikalvenen, Rattenuterus und Meerschweinchenileum. In Experimenten mit isolierten Organen und Geweben (humane Umbilikalvene, Rattenuterus und Meerschweinchenileum) bewirkt LF 160687MS eine kompetitive Antagonisierung von durch Bradykinin induzierten Muskelkontraktionen (Pruneau et al., 1995; 1998a; 1999; Paquet et al., 1999). Mit Ausnahme einer moderaten Affinität von muskarinergen M₁ und M₂ Rezeptor haben auch andere Tests - einschließlich funktioneller Studien bei über 40 verschiedenen Rezeptoren - eine selektive Bindung von LF 160687MS ergeben (Pruneau et al., 1998a; 1999; Paquet et al., 1999).

3. In vivo Experimente:

Die intravenöse Dauerinfusion von LF 160687MS gewährleistet bei Ratten eine dosisabhängige Antagonisierung der von Bradykinin induzierten Hypotension (Pruneau et al., 1999). Desweiteren bewirkt die subcutane Injektion von LF 160687MS bei Ratten eine signifikante Hemmung des von Bradykinin hervorgerufenen Magen- (-69%), Duodenal- (-65%), und Pankreasödems (-57%) (Pruneau et al., 1999). In anderen Experimenten die ebenfalls an Ratten durchgeführt wurden ist die therapeutische Wirksamkeit von LF 160687MS beim stumpfen Schädel- Hirntrauma geprüft worden (100µg/kg/min ab 1h nach Trauma). Bei den behandelten Tieren wurde eine deutliche Verringerung des traumatischen Hirnödems mit Verbesserung der Funktion (Tag 3-7 nach Trauma) gegenüber unbehandelten Tieren mit Trauma gefunden (Pruneau et al., 1999). Vielversprechende Ergebnisse werden auch über Experimente mit Ratten

nach Controlled Cortical Impact- Trauma des Gehirns berichtet. Bei diesen Versuchstieren wurde LF 160687 MS 5 Min. nach Trauma intracutan injiziert, 24 Stunden später zeigte sich eine signifikante Abschwächung des traumatischen Hirnödems (Stover et al., 1999).

F. Therapeutische Wirksamkeit der selektiven Bradykinin B2- Rezeptorblockade durch LF 160687MS beim vasogenen Hirnödem

In den eigenen Versuchen konnte erstmals gezeigt werden, dass durch selektive B2- Rezeptorblockade eine wirksame Hemmung des posttraumatischen vasogenen Hirnödems gewährleistet wird. Mit Hilfe der fokalen Kälteläsion des Gehirns war es möglich, die Effektivität der selektiven B2- Rezeptorblockade unter standardisierten Versuchsbedingungen auf die Entwicklung des vasogenen Hirnödems zu untersuchen.

Aufgrund der bereits erwähnten Vorversuchen mit LF 160687MS (Pruneau et al., 1995; 1998a; 1999; Paquet et al., 1999) konnte von einer wirksamen Blockade des Antagonisten mit dem Bradykinin B2- Rezeptor ausgegangen werden. Nebenwirkungen z. B. auf den Blutdruck oder andere wichtige physiologische Parameter sind weder vor noch während des Experimentes beobachtet worden.

Eine an die vorliegenden Experimente gestellte zentrale Frage über die Mediatorfunktion von Bradykinin beim traumatischen Hirnödem wird damit ebenfalls beantwortet. Die Hemmung der pathologischen Kininwirkung durch selektive B2- Rezeptorblockade bei Insulten des Gehirns z. B. der bakteriellen Meningitis (Lorenzl et al., 1996), Ischämie (Kamiya et al., 1993) oder dem Schädel- Hirntrauma (Pruneau et al., 1999; Unterberg et al., 1987) ist erfolgreich und es gelingt das dabei auftretende Hirnödem einzudämmen.

Eine pathophysiologisch gemeinsame Basis hierfür ist der dabei stets auftretende Parenchymschaden des Gehirns und die dadurch provozierte Entzündungsreaktion (Feuerstein et

al., 1997; Francel et al., 1992). Bradykinin bzw. Kinine sind bei vermutlich allen Formen einer Gewebsschädigung früh auftretende Entzündungsmediatoren (Walker et al., 1995). Auch für das Gehirn gibt es überzeugende Befunde, dass das Kallikrein- Kinin System unter akuten pathologischen Bedingungen aktiviert wird - insbesondere solchen, die mit einer Schädigung der Blut- Hirnschranke einhergehen.

Erste Informationen über die Bildung von Kininen, speziell Bradykinin, stützen sich auf den Verbrauch der Kininogenvorstufe, während neuere Befunde eine direkte Zunahme der Bradykinin- Konzentration im betroffenen Hirngewebe zeigen können.

Frühere Schwierigkeiten, das aktive Peptid Bradykinin (bzw. Kallidin) im geschädigten Hirngewebe selbst nachzuweisen, beruhten

(a) auf der fehlenden Verfügbarkeit eines geeigneten Testsystems (z. B. RiA etc.) sowie

(b) auf der raschen Inaktivierung durch Kininasen. Bradykinin hat im Gehirn und Plasma eine Halbwertszeit von nur 30 Sekunden (Kariya et al., 1982).

Die Bestimmung des freien Bradykininmoleküls könnte auch dadurch erschwert werden, dass das Peptid an allseits vorhandene Rezeptoren gebunden wird. Andererseits besteht über die Herkunft von Kinin- Peptiden bei akuten Hirnläsionen kein Zweifel. Der überwiegende Anteil gelangt als Plasmakininogen Vorstufe aus dem Intravasalraum nach Schädigung der Schranke - zusammen mit allen erforderlichen Komponenten der Aktivierung und Inaktivierung wie Kallikrein und Kininasen in der vasogenen Ödemflüssigkeit - in das Gewebe. Weitere Quelle der Bradykininsynthese ist das geschädigte Gewebe selbst. Auch im normalen (!) Gehirn werden alle Bestandteile des Kallikrein- Kininsystems gefunden (Chao et al. 1983, Sicili et al.,1984).

Eine hohe Konzentration bzw. Expression des Systems lässt sich im Plexus choroideus und dem Hypothalamus, aber auch bei Glia und Endothelzellen, kaum aber auf Neuronen nachweisen (Li et al., 1999, Raidoo et al, 1997). Die bisher vorliegenden Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass der quantitativ überwiegende Anteil bei akuten Läsionen des Gehirns auf einen

Übertritt der Komponenten des Kallikrein- Kinin Systems aus dem Intravasalraum ins Gewebe beruht. Die durch das hirneigene System freisetzbaren Mengen von Kininen sind um Größenordnungen geringer, sodass davon kaum ein wirkungsvoller, pathologisch relevanter Beitrag zur Mediatorfunktion des sekundären Hirnschadens erwarten werden kann. Bisherige Konzepte und Befunde hierzu werden durch die jetzt durchgeführten Experimente unterstützt. Das vasogene Hirnödem durch eine fokale Hirnläsion läßt sich durch LF 160687MS dann am wirksamsten hemmen, wenn dessen Applikation bereits vor Trauma beginnt. Mit der Applikation von LF 160687MS 30 oder 60 Minuten nach Läsion kann eine therapeutische Wirkung nicht mehr erzielt werden. Die frühe Gabe von LF 160687MS gewährleistet vermutlich, dass mit Eröffnung der Schranke und Austritt der Ödemflüssigkeit (und LF160687MS) bereits eine ausreichende Menge des Antagonisten im Parenchym vorhanden ist, die zur Bindung aller erreichbaren Bradykininrezeptoren - sowohl im Intravasalraum (Endothel) als auch im Hirnparenchym ausreicht. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Beitrag von Kininen an der Schrankenöffnung nach Läsion durch den Rezeptorblocker erheblich vermindert worden ist.

Vorversuche bei Trauma mit effektiver B2- Rezeptorblockade haben eine abgeschwächte Eröffnung der Blut- Hirnschranke ergeben (Barzo et al., 1997). Da die Moleküle des B2- Rezeptorantagonisten die intakte Bluthirnschranke nicht penetrieren können, muss die therapeutische Wirksamkeit (a) auf der Bindung von intravasalen B2- Rezeptoren sowie (b) von parenchymalen Rezeptoren nach Öffnung der Bluthirnschranke mit Austritt der Antagonisten aus dem Intravasalraum beruhen (s. o.).

Für die mangelnde Wirksamkeit des Rezeptorantagonisten nach Trauma hingegen müssen noch weitere Gründe in Betracht gezogen werden: Im Gegensatz zu anderen Insulten, bei denen sich der Gewebsschaden langsamer entwickelt (z.B. Ischämie), kommt es nach einer fokalen Kälteläsion sofort zur Gewebsnekrose mit Eröffnung der Bluthirnschranke (Klatzo et al., 1958).

Die damit einhergehende Aktivierung des Kallikrein- Kinin Systems, die Bildung von Kininen und deren Bindung an ihre Rezeptoren läuft vermutlich so schnell ab, dass bei verzögerter Verfügbarkeit des Rezeptorantagonisten die Kininrezeptoren bereits gesättigt sind.

Bei erfolgreichen Versuchen zur Inhibition des Kallikrein- Kinin Systems nach einer zerebralen Kälteläsion (Unterberg et al., 1986) wurde kein Rezeptorantagonist, sondern hoch wirksame Kallikreininhibitoren (Aprotinin, SBTI) 15 Minuten nach Insult injiziert. In diesem Experiment wurden Kaninchen als Versuchstiere eingesetzt, bei denen im Gegensatz zu Ratten vermehrt Kallidin als Bradykinin gebildet wird (Bhoola et al., 1992). Ein anderer Grund der mangelhaften Therapiewirkung durch verzögerte Applikation könnte eine zu niedrige Dosis des Rezeptorantagonisten gewesen sein. Bei Behandlungsbeginn vor Trauma konnte eine Dosis von 10µg/kg/min. das posttraumatische Hirnödem um 30% verringern (Plasmaspiegel des Rezeptorblockers ca. 30 ng/ml). Weil diese Dosierung wirksamer war als die ebenfalls geprüfte 10fach höhere Dosis, wurden 10µg/kg/min LF160687MS für die Experimente verwendet. Eine weitere Überlegung für die niedrige Dosis ist, dass Bradykinin (dosisabhängig) nicht nur negative Eigenschaften hat. Kinine sind vermutlich an der Aufrechterhaltung der normalen Hirndurchblutung beteiligt, sie wirken auch an der Stimulierung der NO- Bildung im Endothel mit (Jin et al., 1998; Shigematsu et al., 1999). Solche Bradykininmechanismen sollten nicht gestört werden.

Ein weiteres Argument zur Erklärung der Wirkungslosigkeit der Therapie mit Beginn nach Insult könnte die zu geringe LF 160687MS Konzentration an den B2- Rezeptoren im geschädigten Parenchym als Folge der dort herrschenden Ischämie und des damit verbundenen geringen Wirkstofftransportes dorthin gewesen sein. Die Möglichkeit, dass die Aktivierung des Kallikrein- Kinin Systems innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma zu einer „Hochregulation“ von B2- Rezeptoren führt, wurde unseres Wissen bisher nicht beschrieben.

Bei dem von mir verwendeten fokalen Traumamodell fällt die Hirndurchblutung im perifokalem Gewebe allerdings nicht auf ein ischämisches Niveau ab. Aus diesem Grund sollte der B2-Rezeptorantagonist im gefährdeten, noch vitalen Parenchym verfügbar gewesen sein. Das Minimum der Durchblutung (55% des Ausgangswertes vor Trauma) wird nach einer fokalen Kälteläsion des Gehirns ca. 30 Min. nach Insult erreicht, während die Hirndurchblutung. Innerhalb von 24 Stunden nahezu wieder zu Normwerte zurückkehrt (Plesnila et al., 1997).

Nach Diskussion der oben genannten Punkte lässt sich nicht ausschließen, dass eine höhere Dosis, die in Experimenten mit einem diffusen SHT- Modell (Pruneau et al., 1990) wirksam gewesen ist, auch bei den eigenen Versuchen erfolgreich gewesen wäre. Die sorgfältige Analyse der vorliegenden Ergebnisse über den Bradykinin- B2- Rezeptorantagonisten LF 160687MS – auch unter Berücksichtigung der Befunde anderer Arbeitsgruppen läßt weitere Untersuchungen zur Frage der optimalen Dosis bei akuten Insulten mit Eröffnung der Bluthirnschranke und massiven vasogenen Hirnödemen sinnvoll erscheinen.

V. Zusammenfassung

Der Zweck dieser Untersuchung war die Mediatorenfunktion des aktiven Peptids des Kallikrein-Kinin Systems Bradykinin bei der traumatischen Hirnschwellung als Grundlage einer spezifischen, besser wirksamen Therapie weiter abzuklären. Die Hemmung des Bradykinin B2-Rezeptors durch einen neuartigen Rezeptorantagonisten (LF 160687MS) erschien hierfür geeignet. Im Vergleich zu bisher verfügbaren Antagonisten hat LF 160687MS den Vorzug kein Peptid zu sein. Die Hemmung des Bradykinin B2- Rezeptors mit dieser Substanz wurde daraufhin geprüft, ob sie sich zur Behandlung oder Prävention des vasogenen Hirnödems beim akuten traumatischen Insult des Gehirns eignet.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Durch die kompetitive Bradykinin B2- Rezeptorblockade mit dem selektiven B2- Rezeptorantagonisten LF 160687MS wird das vasogene Hirnödem nach einer fokalen Kälteläsion des Gehirns signifikant abgeschwächt - wenn die Behandlung vor dem Trauma begonnen wird.

Der Erfolg der Rezeptorblockade ist an der Abschwächung der Hemisphärenschwellung des Gehirns nach Insult (um ungefähr 1/3 gegenüber der bei unbehandelten Versuchstieren mit Trauma) erkennbar.

Eine Abnahme der Hirnschwellung in dieser Größenordnung wäre bei Patienten mit schweren Schädel- Hirntrauma ein vielversprechender therapeutischer Fortschritt mit Chancen das Outcome bei einem geringeren neurologischen Defizit zu verbessern. Nach den eigenen Befunden sieht es allerdings so aus, dass die Hemmung der Kininwirkung durch B2- Rezeptorblockade sehr früh erfolgen muss, was mit einem erfolgreichen klinischen Einsatz kaum vereinbar erscheint. Davon unabhängig bestätigen die Ergebnisse das aktive Peptid des Kallikrein- Kininsystems Bradykinin als wichtigen Mediator des traumatischen Hirnödems, dessen pathophysiologische Wirkung durch B2- Rezeptoren vermittelt wird.

Es erscheint deshalb sinnvoll, weitere Studien durchzuführen, um die bisher unwirksame Behandlung mit dem B2- Rezeptorblocker nach akuten Insulten des ZNS zu optimieren. Ansätze hierfür bieten eine Veränderung der Dosis als auch die Beantwortung nach dem Ausmaß des therapeutischen Fensters nach Insult.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die selektive Bradykinin B2- Rezeptorblockade ein kausales Therapiekonzept beim vasogenen Hirnödems nach einem akuten Insult darstellt und das Kallikrein- Kininsystem eine zentrale Rolle als Mediator für den traumatischen Sekundärschaden des Gehirns spielt.

VI. Literaturverzeichnis

1. AANS/ Brain Trauma Foundation (1985) Guidelines for the management of severe head injury
2. Adams JH (1984) Head injury. In: Hume- Adams J, Corsellis JAN, Duchen LW (eds.), Greenfields's Neuropathology, 4th edition London: Edward Arnold: 85-124
3. Adams JH, Mitchell DE, Graham DL, Doyle D (1977) Diffuse brain damage of intermediate impact type. Brain 100: 489-502
4. Aramori I, Zenkko J, Morikawa N, O' Donnell N, Assano M, Nakamura K, Iwami, M, Kojo H, and Notsu Y (1997) Novel subtype- selective Nonpeptide Bradykinin receptor antagonists FR167344 and FR173657. Mol. Pharmacol. 51:171- 176
5. Asano M, Inamura N, Hatori C, Sawai H, Fujiwara T, Katayama A, Kayakiri H, Satoh S, Abe Y, Inoue T, Sawada Y, Nakahara K, Oku T, and Okuhara M (1997) The identification of an orally active, Nonapeptide Bradykinin B2 receptor antagonist FR173657. Br. J. Pharmacol. 120: 617-624
6. AWMF (1997) Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel- Hirn-Trauma; Notfallmedizin 10:466ff

7. Baethmann A (1998) Secondary brain damage from severe head injury and cerebral ischemia- the role of glutamate. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2: 567-571
8. Baethmann A, Kempfski O (1992) Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. Neurochemical correlates of cerebral ischemia. In: *Advances in Neurochemistry* 7, (eds.) Bazan NG, Braquet P, Ginsberg MD, Plenum Press New York
9. Baethmann A, Maier Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, and Schührer (1988) Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit. Care. Med.* 16: 972-978
10. Baethmann A, Oettinger W, Rothenfusser W, Kempfski O, Unterberg A, and Geiger R. (1980) Brain edema factors: current state with particular reference to plasma constituents and glutamate. *Adv. Neurol.* 28:1982
11. Baethmann A (1978) Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg. Rev.* 1: 85-100
12. Bartholomew JM and Proud D, (1991) Bradykinin antagonists. *Ann. Rev. Pharmac. Toxic.* 31: 129-162
13. Barzo P, Marmorou A, Fatouros P, Hayasaki K and Crowin F (1997) Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusing – weighted imaging. *J. Neurosurg.* 87: 900-907

14. Bennett BR, Jacobs LM, Schwarz RJ (1989) Incidence and cost and DRG- based reimbursement for traumatic brain injured patients: A 3- year experience. *J. Trauma* 29: 556-565
15. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K (1992) Bioregulations of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmac. Rev.* 44: 1-80
16. Bullock R (1993) Pathophysiological alterations in the central nervous system due to trauma. *Schweiz. Med. Wochenschr.*;123 (11): 449-58
17. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood- brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.* 429: 47-62.
18. Chao J, Whoodley M, Chao L and Margolius HS (1983) Identification of tissue kallikrein in brain and in cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J. Biol. Chem.* 258: 15173-15178
19. Chesnut RM, Marshall SB, Piek J (1993) Early and late systemic hypotension as a frequent and fundamental source of cerebral ischemia following severe head injury in the Traumatic Coma Data Bank. *Acta Neurochir. (Suppl.)* 59: 121-125
20. Clasen RA, Brown DV, Leavitt S, Haas G M (1953) The production by Liquid Nitrogen of Acute Closed Cerebral Lesions. *Surg Gyne. and Obs.* 96: 605- 613

21. Clasen RA, Sky- Peck HH, Pandolfi S, Clasen JR (1967) The chemistry of isolated edema fluid in experimental cerebral injury. In Klatzo I, Seitelberger F (eds.): Brain Edema. Springer: Wien 536- 553.
22. Dacey RG, Basset JE, Takayasu M (1988) Vasomotor responses of rat intracerebral arterioles to vasoactive intestinal peptide. Substance P, Neuropeptide Y and Bradykinin. J Cereb. Blood Flow Metab. 8: 254-261
23. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL,. (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. J Neurosci Methods 39(3):253-62.
24. D'Orleans- Juste P, De Nucci G, Vane JR, 1989 Kinins act on B1 and B2 receptors to release conjointly endothelium- derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. Br. J. Pharmacol. 96, 920-926
25. Dray A., Perkins MN 1993 Bradykinin and inflammatory pain. Trends Neurosci. 16, 99-104
26. Ellis EF, Heizer ML, Hambrecht GS, Holt SA, Stewart JM, Vavrek RJ (1987) Inhibition of bradykinin- induced and kallikrein- induced cerebral arteriolar dilatation by a specific bradykinin antagonist. Stroke 18: 792-795
27. Ellis EF, Holt SA, Wei EP, Kontos HA (1988) Kinins induced abnormal vascular reactivity. Am. J. Physiol. 255: H397- H400

28. Ellis EF, Chao J, Heizer ML (1989) Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J. Neurosurg.* 71: 437- 442
29. Eriskat J Schürer L, Kempfski O, Baethmann A (1994) Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir. Suppl*, 60:425-7
30. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murre3y KM, Darl WG (1981) Responses to cortical injury I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res. Apr.* 27. 211(1): 67-77
31. Feuerstein GZ, Wang X Barone FC (1997) Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma . Potential new therapeutic targets. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 825: 179-193
32. Foda M, Marmarou (1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg.* Feb.;80 (2): 303-13
33. Francel PC (1992) Bradykinin and neuronal injury. *J Neurotrauma* 9 Suppl. 1:27-45
34. Frey EK and Kraut H (1928) Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 133: 1-56
35. Gecse A, Mezei Z and Tellegdy G (1989) The effect of bradykinin and its fragments on the arachnoid cascade of brain microvessels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 247A, 249-254

36. Gennarelli TA; Graham DI 1998, Neuropathology of the Head Injuries Semin. Clin. Neuropsychiatry 3 (3): 160-175
37. Gera L, Stewart JM, Whalley ET (1996) New bradykinin antagonists have very high potency at B1. receptor. Immunopharmacology 33: 183-185
38. Görlach C, Benyo Z, Wahl M (1998) Dilator effect of bradykinin and acetylcholine in cerebral vessels after brain lesion. Kidney Int. Suppl. 67: 226- 227
39. Graham DI; Adams JH, Doyle D (1978) Ischemic brain damage in fatal non-missile head injuries. J Neurol Sci. 39: 213- 34
40. Graham DI; Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, Mc Lellan DR (1989) Ischemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. J Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 52 (3): 346-50
41. Gurdjian ES (1978) Acute head injuries. Surg. Gyn. Obst. 146: 805-820
42. Hall JM (1992) Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. Pharmacol. Ther. 56: 131-190
43. Hall ED, Braugher JM (1988) The role of oxygen radical- induced lipid peroxidation in acute central nervous system trauma. In Haliwell B (ed.): Oxygen Radicals and Tissue Injury Symposium. Bethesda, MD, FASEB. 92-98

44. Hammersen F, Unterberg A, Hammersen E (1988) The ultrastructural basis of interactions between leucocytes and endothelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 242: 77-84
45. Hösli L., Hösli E, Kaeser H, and Levkovits M (1992) Colocalisation of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinalcord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. *Neurosci. Lett.* 148, 114-116
46. Hösli E, Hösli L, (1993) Autoradiographic localisation of binding sites for neuropeptide Y and Bradykinin on astrocytes. *Neuroreport.* 1993 Feb;4(2):159-62
47. Jennett B, Frankowski RF (1990) The epidemiology of head injury. Braakman (ed.) *Handbook of Clinical Neurology.* NY, Elsevier Science: 1-16
48. Kamitani T, Little M, Ellis EF (1985) Evidence for a possible role of the brain kallikrein-kinin system in then modulation of the cerebral circulation. *Circ. Res.* 57:545-552.
49. Kamiya T, Katayama F, Kashiwagi F and Terashi A (1993) The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24:571-575
50. Kariya K, Yamauchi A, and Chatani Y. (1982a) relationship between central actions of bradykinin and prostaglandin in the conscious rat. *Neuropharmacol.* 21: 267- 272

51. Kariya K, Yamauchi A, Hattori S, Tsuda Y, and Okada Y (1982b) The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biophys. Res. Commun.* 107: 1461- 1466
52. Karya K, Okamoto H, Kira K (1984) Kinin- forming enzyme in rat brain mitochondria fraction and biological activity of a kinin released from rat plasma kininogen by this enzyme. *Jpn. J. Pharmacol.* 34: 203-210
53. Katusic SZ; Sheperd JT, Vanhoutte PM. (1986) Oxytocin causes endothelium- dependent relaxations of canine basilar arteries by activating V1- vasopressinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 236: 166-170
54. Katusic ZS, Marshall JJ, Kontos HA, Vanhoutte PM (1989) Similar responsiveness of smooth muscle of the canine basilar artery to EDRF and nitric oxide. *Am J Physiol.* H1235-H1239
55. Kimelberg HK (1995) Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg.* 83: 1051-1059
56. Kitamura N, Takagaki Y, Furoto S, Tanaka T, Nawa H and Nakanishi S.(1983) A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens . *Nature* 305: 545- 549

57. Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ (1958) The relationship between edema, blood- brain- barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 17: 548-564
58. Klatzo I (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26: 1-14
59. Klatzo I (1978) Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* 72: 236-239
60. Kochanek PM, Marion DW, Zhang W (1995) Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J. Neurotrauma* 12: 1015- 1025
61. Kontos HA, Wei EP, Povlishock TJ, Christman CW (1984) Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilatation from arachidonate and bradykinin in cats. *Circ. Res.* 55: 295-303
62. Kontos HA, Wei EP, Kurejac R, Ellis Fe, Hess LM (1990) Differences in endothelium- dependent cerebral dilatation by bradykinin and achetylcholine. *Am. J. Physiol.* 258: H1261- H1266
63. Kraus JF, Mc Arthur DL, and Silberman TA (1994) Epidemiology of mild brain injury. *Semin. Neurol.* 14:1-7

64. Lewen A, Matz P, Chan PH (2000) Free radical pathways in CNS injury J. Neurotrauma;17 (10): 871-90
65. Li Z, Tyor WR, Xu J, Chao J and Hogan EL (1999) Immunohistochemical localisation of kininogen in rat spinal cord and brain. Exp. Neurol. 159: 528- 537
66. Lighthall JW, (1988); Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. J. Neurotrauma; 5 (1): 1- 15
67. Lindgren S, Rinder L (1966) Experimental studies in head injury II. Pressure propagation in “percussion concussion”. Biophysik 3; (2) 174- 180
68. Lorenzl SU Ködel U, Frei K und Pfister HW (1996) Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe 140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. Eur. J. Pharmacol. 308: 335-341
69. Lossinski AS, Vorbrodt AW, Wisniewski HM (1983) Ultracytochemical studies of vesicular and canalicular transport structures in the injured mammalian blood- brain barrier. Acta Neuropathol. Berl. 61: 239-245
70. Maier- Hauff K, Baethmann AJ, Lange M, Schürer L, and Unterberg A. (1984) The kallikrein –kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. J. Neurosurg. 61: 97-106

71. Marmarou A (1994); Traumatic brain injury an overview. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 60: 421- 424
72. Marmarou A, Nichols J, Burgess J, Newell D, Troha J, Burnham D, Pitts L (1999) Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. *J Neurotrauma.*;16(6):431-44.
73. Marshall LF, Gattille T, Klauber MR, Eisenberg HM, Jane JA, Luerssen TG, Marmarou A, Foulkes MA (1991) The outcome of severe closed head injury. *J. Neurosurg.* 75: 28-36
74. Mayhan WG (1990) Impairment of endothelium- dependent dilatation of basilar artery during chronic hypertension. *Am. J. Physiol.* 259: H1455- H1462
75. Mayhan WG (1996) Role of activation of bradykinin B2 receptors in disruption of the blood- brain- barrier during acute hypertension. *Brain Res.* 738, 337-341
76. McIntosh TK, Ferriero D (1992) Changes in Neuropeptide Y after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cerebral Blood Flow Metab.*12: 697-702
77. McIntosh T, Smith TH, Meaney DF (1996) Neuropathological sequale of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomedical mechanisms. *Lab. invest.* 74: 315-342

78. Meryman HT (1956) Mechanisms of Freezing in Living Cells and Tissues. *Science* 124: 515- 521
79. Miller JD, Becker DP, Ward JD, Sullivan HG, Adams WE, Rosner MJ (1977) Significance of intracranial hypertension in severe head injury. *J Neurosurg.* 47: 503-516
80. Moore IE, Buontempo JM, Weller RO (1987) Response of fetal and neonatal rat brain to injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 13: 219-228
81. Narotam PK, Rondel TC, Nadvi SS, Bhoola KD, Troha Jm, Parbhoosingh R (1998) Traumatic brain contusions: a clinical role for kinin antagonist CP- 0127. *Acta Neurochir. (Wien)* 140: 793-802
82. Olesen SP, Crone C (1986) Substances that rapidly augment ionic conductance of endothelium in cerebral venules. *Acta Physiol. Scand.* 127: 233-241
83. Olesen SP (1987) Regulation of ion permeability in frog brain venules, significance of calcium, cyclic nucleotides and protein kinase C., *J. Physiol.* 387: 59-68
84. Pappius HM, Gulati DR, (1962) water and electrolyte content of cerebral tissues in experimentally induced edema. *Acta Neuropathol.* 2: 451- 460
85. Pappius HM (1981) Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain. *Ann. Neurol.* 9 (5): 484- 91

86. Paquet JL; Luccarini JM; Fouchet C; Defrene E; Loillier B; Robert C; Belichard P; Cremers B; Pruneau D (1999) Pharmacological characterization of the bradykinin B2 receptor: inter- species variability and dissociation between binding and functional responses. *Br. J. Pharmacol. Mar.*; 126 (5): 1083-90
87. Park CH, Choi SH, Piao Y, Kim S, Lee YJ, Kim HS, Jeong SJ, Rah JC, Seo JH, Lee JH, Chang K, Jung YJ, Suh YH. (2000) Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. *Toxicol. Lett.* May 19, 115 (2) p117-25
88. Perry DC, Snyder SH (1984) Identification of bradykinin in mammalian brain. *J. Neurochem.* 43: 1072-1080
89. Piek J, Chesnut RM, Marshall LF (1992) Extracranial complications of severe head injury. *J. Neurosurg.* 77: 901-907
90. Plesnila N, Eriskat J, Stoffel M, Fürst M, and A Baethmann (1997) rCBF in focal brain trauma assessed by laser doppler scan flowmetry. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 71-73
91. Povlishock JT, Christman CW (1995) The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans– a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 12 (4): 555-64
92. Povlishock JT , Jenkins LW (1995) Are the pathological changes evoked by traumatic brain injury immediate and irreversible? *Brain Pathol.* 5 (4): 415-26

93. Povlishock JT (2000) Pathophysiology of neuronal injury: therapeutic opportunities and challenges. *Clin. Neurosurg.* 46: 113-26
94. Privitera PI, Daum PR, Hill DR, Hiley CR (1992) Autoradiographic visualization and characteristics of [125I] bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Brain Res* 577:73-79
95. Proud D; Mc Glashan DWJ, Newball HH, Schulmann ES, Lichtenstein LM (1985) Imunglobulin E- mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. *Am. Rev. Resp. Dis.* 132: 405-408
96. Pruneau D, Luccarini JM, Fouchet C, Defrene E, Franck RM, Loillier B, Duclos H, Robert C, Cremers B, Belichard P and Paquet JL (1998) LF 16.0335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 125: 365-372
97. Pruneau D; Luccarini JM; Fouchet C; Defrene E; Franck RM; Loillier B; Duclos H; Robert C; Cremers B; Belichard P; Paquet JL (1999) In vitro and in vivo effects of the new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, LF 160335C, on guinea-pig and rat kinin receptors. *Fundamental Clin. Pharmacol.* 13(1): 75-83
98. Pruneau D; Paquet JL; Luccarini JM; Defrene E; Fouchet C; Franck RM; Loillier B; Robert C; Belichard P; Duclos H; Cremers B; Dodey P (1999) Pharmacological profile of LF 160687MS, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist. *Immunopharmacology* ; 43 (2-3): 187-94

99. Pruneau D; Chorny I; Benkovitz V; Artru A; Roitblat L; Shapira Y (1999) Effect of LF 160687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma. *J. Neurotrauma* Nov;16(11):1057-65
100. Pruneau D; Luccarini JM; Defrene E; Paquet JL; Belichard P (1995) Pharmacological evidence for a single bradykinin B2 receptor in the guinea-pig. *Br J. Pharmacol.*; 116 (3): 2106-12
101. Pruneau D; Luccarini JM; Robert C; Belichard P (1994) The kinin B1 receptor antagonist des-Arg9-[Leu8]bradykinin: an antagonist of the angiotensin AT1 receptor which also binds to the AT2 receptor. *Br. J. Pharmacol.*;114 (1): 115-8
102. Pruneau D; Duvoid A; Luccarini JM; Belichard P; Bonnafous JC (1994) Induction of kinin B1 receptor-dependent vasoconstriction following balloon catheter injury to the rabbit carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*;111 (4): 1029-34
103. Rachinsky M, Pruneau D, Artru A, Kapuler V, Alonchin A, Smolanezki Y, Shapira Y (2001) *J. Trauma.* 11: 944-948
104. Raidoo DM, Bhoola KD (1997) Kinin receptors on human neurones. *J. Neuroimmunol.* 77: 39-44
105. Raymond JJ, Robertson DM, Dinsdale HB (1986) Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood- brain barrier. *Can J Neurol Sci* 13:214-220

106. Regoli D, Barbe J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1- 47
107. Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S (1990) Kinin receptor subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15. Suppl. 6: 30-38
108. Reulen HJ, Medzihradsky F, Enzenbach R, Marguth F, Brendel W (1969) Electrolytes, fluids, and energy metabolism in human cerebral edema. *Arch. Neurol.* 21:517-525
109. Reulen HJ, Graham R, Fenske AR, Tsuyumu M, Klatzo I, (1976) The role of tissue pressure and bulk flow in the formation of cold- induced edema. In: Pappius HM, Feindel W: *Dynamics of Brain Edema*. Springer. Berlin- Heidelberg- New York, 103- 112
110. Reulen HJ, Graham R, Spatz M, Klatzo I (1977) Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J. Neurosurg.* 46: 24-35
111. Reulen HJ, Tsuyumu M, Tack A, Fenske AR, Prioleau GR (1978) Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic brain edema . *J. Neurosurg.* 48: 754- 764
112. Rosenblum WI (1986) Endothelium- dependent relaxation demonstrated in vivo in cerebral arterioles. *Stroke* 17: 494-497

113. Schachter M (1979) Kallikreins (Kininogenases)- a group of proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Rev* 31: 1-17
114. Schilling L, Wahl M (1997) Brain edema: pathogenesis and therapy. *Kidney Int.* 51 Suppl. 59 S. 67-75
115. Schürer L (1987) Hirnstoffwechsel und Funktion beim experimentellen Schädel- Hirn-Trauma. Inauguraldissertation. München
116. Shisheva A; Printz MP, Paul M, Ganten D (1983) Evidence for kinin forming activity in rat brain. *Fed. Proc.* 43: 1021
117. Sicili AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M and Carretero (1984) Kallikreinn- kinins in the central nervous system. *Clin. Exp. Hypertens.* 6: 1731-1738
118. Sria A, Lundberg JM, Skofitsch G, Lembeck F (1983) Vascular protein leakage in various tissues induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. *Naunyn- Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 324: 212- 218
119. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden (1992-1995), Sterbefälle bei Schädel- Hirntrauma durch Schädelfraktur (ICD 800- 804) und intrakranielle Verletzungen (ICD 850-854) Fachserie Gesundheitswesen, Reihe 4

120. Stephens GJ, Marriott Dr, Djamgoz MBA and Wilkin GP (1993) Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultured rat cortical oligodendrocytes. *Neurosci. Lett.* 153, 223-226
121. Stover JF, Dohse NK, Unterberg A (2000) Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide B2 receptor antagonist LF 160687MS MS after controlled cortical impact in rats. *J. Neurosurg.* 92: 853-859
122. Toda N (1977) Actions of bradykinin on isolated cerebral and peripheral arteries. *Am. J. Physiol.* 232: H267- H276
123. Unterberg A, Baethmann A, Hack U (1983) Cerebral blood flow and metabolism during bradykinin exposure. In Baldy- Moulinier M, Ingvar DH, Meldrum BS Eds *Cereb Blood Flow Metab. and Epilepsie*. London: John Libbey: 174-179
124. Unterberg A, Wahl M, Baethmann A, (1984) Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 4:574-585
125. Unterberg A, Hack U, Baethmann A (1985) Blood flow metabolism and function of the brain during cerebral administration of bradykinin. IN: Dietz H, Brock M, Klinger M, Eds. *Adv. Neurosurg. Vol 13* Berlin: Springer 1985: 326- 329
126. Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Müller- Esterl W (1986) The kallikrein-kinin system in vasogenic brain edema . Part 3; Inhibition of the kallikrein –kinin system in traumatic brain swelling. *J. Neurosurg.* 64: 269-276

127. Unterberg A, Wahl M, Hammersen F, and Baethmann A, (1987) Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid. *Acta Neuropathol. Berl.* 73: 209-219
128. Unterberg A, Baethmann A (1984) The kallikrein –kininsystem as mediator in vasogenic brain edema. *J. Neurosurg.* 61: 87- 96
129. Wahl A, Young AR, Edvinsson L, Wagner F (1983a) Effects of bradykinin on pial arteries and arterioles in vitro and in situ. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 231-237
130. Wahl M, Young AR, Edvinsson L, Wagner F (1983b) Effects of kininase II inhibitors on the vasomotor response to bradykinin on feline intracranial and extracranial arteries in vitro and in situ. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 339-345
131. Wahl M, Unterberg A, Baethmann A (1985) Intravital fluorescence microscopy for the study of blood- brain barrier function. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 4: 3-18
132. Wahl M, Lauritzen M, Schilling L, (1987) Change of cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in cats and rats. *Brain Res.* 411: 72- 80
133. Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L. (1988) Mediators of blood brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 8: 621-634

134. Walker K, Perkins M, Dray A., (1995) Kinins and Kinin Receptors in the nervous system. *Neurochem. Int.* 26: 1-16
135. Werle E and Berek K (1948) Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angewandte Chemie* 60: 53-72
136. Whalley ET, Wahl M (1983a) Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 323: 66-71
137. Whalley ET, Wahl M (1983b) The effect of kininase II inhibitors on the response of feline cerebral arteries to bradykinin and angiotensin. *Pflügers arch* 398: 175- 177
138. Whalley ET, Amure YO, Lye RH (1987a) Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar artery in vitro. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 335: 433-437
139. Whalley ET, Nwator I, Stewart JM, Verek RJ, (1987b) Analysis of the receptor mediating vascular actions of bradykinin. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 336: 430- 433
140. Whittle IR; Piper IR and Miller JD (1992) The role of bradykinin in the etiology of vasogenic brain edema in perilesional brain dysfunction. *Acta Neurochir.* 115, 53-59

141. Wiemer G, Popp R, Scholkens BA, Gogelein H (1994) Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 638: 261-266
142. Yang ST, Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD (1991) Mechanism of impaired endothelium- dependent cerebral vasodilatation in response to bradykinin in hypertensive rats. *Stroke* 22:1177- 1182

Danksagung:

Nach dem Abschluss der Arbeit gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in sein Neuroteam. Während der Zeit am Institut hatte ich Gelegenheit die Methodik wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen und wichtige Grundlagen für meine heutige Arbeit zu erlangen. Professor Baethmann war mir durch seine Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik bei Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit stets eine große Hilfe. Desweiteren ist Ihm dafür zu danken, dass er mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Symposien im In- und Ausland ermöglicht, und den Kontakt zu namhaften internationalen Wissenschaftlern hergestellt hat. An die kulturellen „Show-Auftritte“ seines „Hirnteams“ und an die Stunden der aufopferungsvollen Proben mit ihm werde ich mich immer gerne erinnern.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer, für die Aufnahme in sein Institut. Hier erhielt ich als Doktorand eine beispielhafte Ausbildung und Förderung. Seine fundierte Argumentation bei Diskussionen und das Niveau, der unter seiner Betreuung entstandenen wissenschaftlichen Arbeiten hat mich nachhaltig beeindruckt.

Herrn PD. Dr. Nikolaus Plesnila, für die vielen Stunden stets freundlicher und fundierter Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Ich hoffe, dass unser freundschaftliches Verhältnis, welches sich durch die gemeinsame Arbeit entwickelt hat, auch in Zukunft bestehen bleibt. Ich freue mich auf die Diskussion neuer Ideen und die Entwicklung weiterer gemeinsame Projekte.

Herrn Dr. Jörg Eriskat, für die spontane und aufopfernde Mitbetreuung meiner Arbeit während Nicks Amerikaaufenthalt. Durch ihn lernte ich Statistik- und Graphikprogramme anwenden und meine Ergebnisse auf Kongressen angemessen zu präsentieren.

Herrn Dr. Jürgen Peters, für seine humorvolle und geduldige Führung durch den „Dschungel“ der Datenverarbeitung und Statistik.

Den medizinisch technischen Assistentinnen für die hervorragende Hilfe bei der Auswertung der Laborergebnisse.

Abschließend mein besonderer Dank an alle hier nicht angesprochenen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Joachim A. Schulz
Geburtsdatum: 2. Januar 1971
Geburtsort: München
Adresse: Loisachstr. 11; 82418 Murnau
Eltern: Peter-Jochen Schulz, Regierungsdirektor/ Regierung von Oberbayern
Christine Schulz, geb. Strobl, Rektorin und Beratungsrektorin

Ausbildung:

1977-1981 Grundschule/ Krailling
1981-1990 Gymnasium/ Starnberg, Abitur
1990-1991 Grundwehrdienst , 1. Gebirgsdivision/ Murnau
1993-2000 Hochschulstudium
 Universität des Saarlandes/ Homburg-Saar
 Ludwig- Maximilians Universität/ München
1999-2000 Praktisches Jahr:
 Hals- Nasen- Ohrenheilkunde: Klinikum Großhadern, LMU-
 München; Prof. Dr. Kastenbauer, Hals- Nasen- Ohrenklinik
 Chirurgie: Klinikum Großhadern, LMU- München
 Prof. Dr. Schildberg, Chirurgische Klinik
 Neurochirurgie: UCSD Medical Center Univ. of California/
 San Diego; Prof. Dr. L.F. Marshall, Div. Neurol. Surgery
 Innere Medizin: KKH- Starnberg; Prof. Dr. Lydtin, Innere Abteilung

Berufliche Tätigkeit:

- 2001-02 02.01.01 bis 31.06.02 AiP. in der Abteilung für Plastische-, Hand- und
Rekonstruktive Mikrochirurgie, BG- Unfallklinik Murnau
bei Chefarzt Dr. med. A. Schmidt
- seit 2002 Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie, BG- Unfallklinik
Murnau bei Chefarzt Dr. med. H. Jaksche

Murnau, 20.04.05

Joachim Schulz