Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie

Edwin Friedrich Hungerhuber

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. J. - C. Tonn

Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie

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

vorgelegt von
Edwin Friedrich Hungerhuber

aus
Trostberg

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. R. Schmid-Elsaesser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Konnerth
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Hamann
	Priv. Doz. Dr. Dr. A. E. Goetz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. S. Zausinger
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	05.06.2003

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 KLINISCHE ASPEKTE DER ZEREBRALEN ISCHÄMIE 1

1.2 ZIEL DIESER UNTERSUCHUNG 2

2 EINFÜHRUNG IN DIE NEUROPROTEKTION 3

2.1 PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN 3

2.1.1 Globale Ischämie 3

2.1.2 Fokale Ischämie 4

2.1.3 Mechanismen der Zellschädigung 4

2.1.3.1 Exzitotoxische Wirkung von Neurotransmittern 7

2.1.3.2 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration 9

2.1.3.3 Bildung von freien Sauerstoffradikalen 10

2.2 MÖGLICHKEITEN DER PHARMAKOTHERAPIE 11

2.2.1 Antagonisten der exzitatorischen Aminosäuren 12

2.2.1.1 Hemmung der präsynaptischen Freisetzung 12

2.2.1.2 NMDA-Rezeptor-Antagonisten 13

2.2.1.3 Non-NMDA-Rezeptor-Antagonisten 14

2.2.2 Kalziumantagonisten 14

2.2.3 Sauerstoffradikalfänger 15

2.2.3.1 Endogene Antioxidantien 15

2.2.3.2 Synthetische Antioxidantien 16

2.3 ZEREBROPROTEKTIVE PHARMAKA IN DER NEUROCHIRURGIE 18

2.3.1 Anästhetika 18

2.3.2 Nimodipin 19

2.3.3 Mannitol 19

2.3.4 Kortikosteroide 20

2.3.5 „Sendai-Cocktail“ 20

2.4 HYPOTHERMIE 21

2.5 KOMBINIERTE PHARMAKOTHERAPIE 22

2.5.1 Glutamatantagonisten und Kalziumkanalblocker 22

2.5.2 Glutamat-/Kalziumantagonisten und Sauerstoffradikalfänger 23

2.5.3 Hypothermie und medikamentöse Therapie 23

2.6 FRAGESTELLUNG 24

3 MATERIAL UND METHODEN 25

3.1 MODELL DER TRANSIENTEN FOKALEN ISCHÄMIE 25
3.2 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG 26
3.3 VERSUCHSABLAUF DER AKUTPHASE 27
3.3.1 Narkoseeinleitung und Narkoseführung 29
3.3.2 Kontrolle der physiologischen Parameter 29
3.3.2.1 Blutdruck 29
3.3.2.2 Arterielle Blutgase 30
3.3.2.3 Hämoglobin und Hämatokrit 30
3.3.2.4 Blutzucker 30
3.3.2.5 Temperatur 30
3.3.3 Messung des kortikalen Blutflusses 31
Ableitung des Elektroenzephalogramms (EEG) 34
3.3.4 Verabreichung der Medikamente 34
3.3.5 Induktion der reversiblen fokalen Ischämie 36
3.3.6 Operationsende 37
3.4 VERSUCHSABLAUF DER CHRONISCHEN PHASE 38
3.4.1 Protokollierung der Gewichtsentwicklung 39
3.4.2 Bestimmung funktioneller Defizite 39
3.4.3 Quantifizierung des histomorphologischen Schadens 41
3.5 STATISTISCHE ANALYSE 43
3.6 EXPERIMENTELLE GRUPPEN 43
3.6.1 Studie I: Dextromethorphan und Tirilazad 44
3.6.2 Studie II: Magnesium und Tirilazad 45
3.6.3 Studie III: Magnesium, Tirilazad und Hypothermie 46

4 ERGEBNISSE 47

4.1 STUDIE I: DEXTROMETHORPHAN UND TIRILAZAD 47
4.1.1 Physiologische Kontrollparameter 47
4.1.2 Zerebraler Blutfluss 49
4.1.3 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite 51
4.1.4 Histomorphologischer Schaden 53
4.1.4.1 Gesamtes Infarktvolumen 53
4.1.4.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien 53
4.2 STUDIE II: MAGNESIUM UND TIRILAZAD 55
4.2.1 Physiologische Kontrollparameter 55

4.2.2 Zerebraler Blutfluss 57
4.2.3 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite 58
4.2.4 Histomorphologischer Schaden 59
4.2.4.1 Gesamtes Infarktvolumen 59
4.2.4.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien 61
4.3 STUDIE III: MAGNESIUM, TIRILAZAD UND HYPOTHERMIE 62
4.3.1 Physiologische Kontrollparameter 62
4.3.2 Zerebraler Blutfluss 64
4.3.3 Elektrophysiologische Erholung 66
4.3.4 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite 68
4.3.5 Histomorphologischer Schaden 69
4.3.5.1 Gesamtes Infarktvolumen 69
4.3.5.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien 71

5 DISKUSSION 73

5.1 DISKUSSION DER METHODIK 73
5.1.1 Physiologische Kontrollparameter 73
5.1.2 Intraluminales Fadenmodell 75
5.1.3 Laser-Doppler Flowmetrie 76
5.1.4 Elektroenzephalographie 78
5.1.5 Quantifizierung der ischämischen Schädigung 79
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE 80
5.2.1 Studie I: Dextromethorphan und Tirilazad 80
5.2.2 Studie II: Magnesium und Tirilazad 83
5.2.3 Studie III: Magnesium, Tirilazad und Hypothermie 86

6 ZUSAMMENFASSUNG 90

7 LITERATURVERZEICHNIS 91

8 DANKSAGUNG 125

9 LEBENSLAUF 127

Einleitung

1.1 Klinische Aspekte der zerebralen Ischämie

Zerebrovaskuläre Erkrankungen stehen in der Todesursachenstatistik hinter den Herzkreislauf- und Krebserkrankungen auf Rang drei und stellen eine der häufigsten Ursachen für Invalidität in höherem Lebensalter dar. So sterben allein in den alten Bundesländern jährlich etwa 100.000 Menschen an den Folgen eines zerebralen Infarkts, weitere 70.000 bis 90.000 überleben mit bleibenden neurologischen Schäden, wie Halbseitenlähmung, Sprach- und Verhaltensstörungen.[244]

Im Gegensatz zum Schlaganfall ist eine zerebrale Ischämie in der Neurochirurgie häufig vorhersehbar. Die temporäre Unterbindung einer Hirnarterie ist bei vielen Operationen, z.B. Aneurysmaausschaltung, Carotisendarterektomie oder Bypassoperationen, unumgänglich. Durch diesen temporären Verschluss wird das Risiko der vorzeitigen Ruptur eines Aneurysmas gesenkt bzw. das Eröffnen eines Gefäßes zur Durchführung einer Anastomose erst ermöglicht. Gleichzeitig gefährdet dieses Vorgehen den Patienten, durch die resultierende fokale Ischämie dauerhafte neurologische Ausfälle zu erleiden.

Aus Mangel an geeigneten therapeutischen Verfahren wurde besonders in den letzten Jahren intensiv nach neuen Behandlungsmöglichkeiten geforscht.[109;217] Eine Reihe von Methoden und Pharmaka haben im Tierexperiment und beim Menschen eine nachweisbare zerebroprotektive Wirkung gezeigt. Die pathophysiologischen Vorgänge, die zur ischämischen Schädigung führen, sind jedoch äußerst komplex, so dass es fraglich erscheint, ob durch einen einzigen Arzneistoff eine ausreichende Neuroprotektion erreicht werden kann. Es liegt daher nahe, verschiedene Methoden und Pharmaka zu kombinieren, um einen maximalen Schutz vor den Folgen einer zerebralen Ischämie zu erreichen.[90]

1.2 Ziel dieser Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, hinsichtlich der Problematik eines temporären Gefäßverschlusses einen kombinierten therapeutischen Ansatz zur Vermeidung ischämischer Schädigungen und damit von irreversiblen neurologischen Ausfällen zu entwickeln, und dessen Wirksamkeit im Tierexperiment an Ratten zu überprüfen.

Am experimentellen Modell einer temporären fokalen zerebralen Ischämie wurde im Sinne einer Prophylaxe das neuroprotektive Potential verschiedener Wirkstoffe sowohl im monotherapeutischen Ansatz als auch in kombinierter Anwendung überprüft. Um die Voraussetzung für einen eventuellen klinischen Einsatz zu gewährleisten, wurden insbesondere Medikamente mit bereits vorhandener Zulassung für den Einsatz am Patienten verwendet. In letzter Zeit wurde vermehrt der neuroprotektive Effekt moderater Hypothermie während neurochirurgischer Operationen genutzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher auch untersucht, ob durch die zusätzliche Anwendung einer vielversprechenden medikamentösen Kombinationstherapie der protektive Effekt moderater Hypothermie gesteigert werden kann.

1.3 Pathophysiologische Grundlagen

Zerebrale Ischämie ist die kritische Absenkung der Hirndurchblutung unter die sogenannte Infarktschwelle. Sie führt zu einer mangelhaften Versorgung des Gehirns mit Substraten, z.B. Sauerstoff und Glukose, sowie zu einer Akkumulation von metabolischen Abfallprodukten. Im Wesentlichen wird zwischen fokaler und globaler zerebraler Ischämie unterschieden.[288]

1.3.1 Globale Ischämie

Eine globale zerebrale Ischämie entsteht durch einen Blutdruckabfall oder einen Herz-Kreislauf-Stillstand, z.B. beim kardiogenen Schock. Sie betrifft das gesamte Gehirn und ist komplett oder nahezu komplett. Wird das Ereignis überlebt, ist die Ischämie zeitlich begrenzt. Das histopathologische Korrelat entspricht einer neuronalen Nekrose in sogenannten selektiv vulnerablen Hirnarealen.[246] Sobald die Durchblutungsstörung ein bestimmtes Ausmaß überschreitet treten Grenzzoneninfarkte auf. Während bei fokaler Ischämie alle Zellarten, einschließlich Neurone, Glia- und Endothelzellen betroffen sind, kommt es bei der globalen Ischämie zunächst zum Untergang vulnerabler Neurone. Zu diesen Nervenzellen zählen: CA1-Pyramidenzellen und CA4-Neurone des Hippokampus, Neurone der Schichten 3, 5 und 6 des Neokortex, Neurone im Striatum und Purkinjezellen des Kleinhirns.[247;49]

Allgemein kann man annehmen, dass das Gehirn nach fünf bis acht Minuten eines Herz-Kreislauf-Stillstands irreversibel geschädigt ist. Eine Schädigung dieser Zellen beeinträchtigt das Gedächtnis, Emotionen, Antrieb und bewirkt Lähmungen sowie Koordinationsstörungen.[51]

1.3.2 Fokale Ischämie

Die fokale Ischämie ist auf einen Teil des Gehirns beschränkt, kann permanent andauern und ist in der Regel inkomplett, da eine Restdurchblutung über Kollateralgefäße erhalten bleibt. Zu einer fokalen Ischämie kommt es unter anderem durch Stenosierung oder Verschluss einzelner Hirnarterien. Ist die Versorgung eines Hirnareals mit Glukose und Sauerstoff unterbrochen, bildet sich bei ausreichender Schwere und Dauer der Ischämie im Zentrum dieses Areals eine Parenchymnekrose, ein Hirninfarkt aus. Das Infarktzentrum ist umgeben von der sogenannten Penumbra.[10] Diese perifokale Zone wird über Kollateralgefäße mit einer Restdurchblutung von ca. 20-30% der normalen Hirndurchblutung versorgt. Die Zellen in dieser Zone stellen zwar ihre Funktion ein, sind jedoch lebensfähig und behalten ihre strukturelle Integrität. Hält die Mangelversorgung länger an oder nimmt die Hirndurchblutung weiter ab, kann auch in der Penumbra der irreversible Zelltod eintreten.[51] Diese Schädigung, die typischerweise zur Pan-Nekrose von Hirnparenchym führt, scheint mit einer exzessiven Azidose und der Produktion freier Radikale assoziiert zu sein.[290] Die Folgen einer fokalen Ischämie sind Halbseitenlähmungen und - je nach betroffenem Hirnareal - Sprachstörungen sowie der Ausfall höherer Hirnfunktionen.[244]

1.3.3 Mechanismen der Zellschädigung

Der Mangel an therapeutischen Möglichkeiten hängt u.a. mit dem bisher unvollständigen Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen und dem Zeitverlauf der ischämischen Schädigung zusammen. Durch die zugrundeliegende primäre Durchblutungsstörung werden vielfältige Prozesse ausgelöst, die selbständig ablaufen bzw. erst während der Reperfusion aktiviert werden.

Wichtige Vorgänge sind die neuronale Membrandepolarisation, der Ausfall des aeroben Energiestoffwechsels sowie der Austritt von Kaliumionen (K^+) und Einstrom von osmotisch wirksamen Natrium- (Na^+) und Chloridionen (Cl^-). Da Sauerstoff nicht mehr verfügbar ist, wird Glukose anaerob verstoffwechselt und Laktat gebildet. Die Laktatazidose führt zur weiteren Schädigung von Zellen.[115] Ein zentraler Mechanismus ist die Überschwemmung des intrazellulären Kompartiments mit Kalziumionen (Ca^{2+}) und folgender Aktivierung des Zellstoffwechsels. Der Ca^{2+}-Einstrom wird u.a. ausgelöst durch eine

rezeptorabhängige Öffnung von Ca^{2+}-Kanälen, z.B. als Folge der präsynaptischen Glutamatfreisetzung. Durch Bildung von Arachidonsäure und deren Metabolisierung entstehen eine Fülle von biochemischen Folgeprodukten, u.a. Leukotriene, Thromboxane, Prostaglandine sowie freie Radikale, welche die Zelle zusätzlich schädigen.[49;284]

Nach derzeitigem Wissensstand stehen u.a. die massive Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration, die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und der Einstrom von Kalzium in die Zelle als pathophysiologische Hauptmechanismen im Vordergrund.

Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte synoptische Darstellung der verschiedenen Schädigungsmechanismen und ihre Interaktionen. Statt von einer ischämischen Schädigungskaskade spricht man besser von einem Netzwerk sich gegenseitig beeinflussender und auch überschneidender Kaskaden. Ein zentrales Ereignis ist die Überschwemmung des intrazellulären Kompartiments mit Ca^{2+}. Die verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen, die zur Erhöhung der intrazellulären Kalzium-konzentration und nachfolgend zur Zellschädigung führen, sind im folgenden näher erläutert.

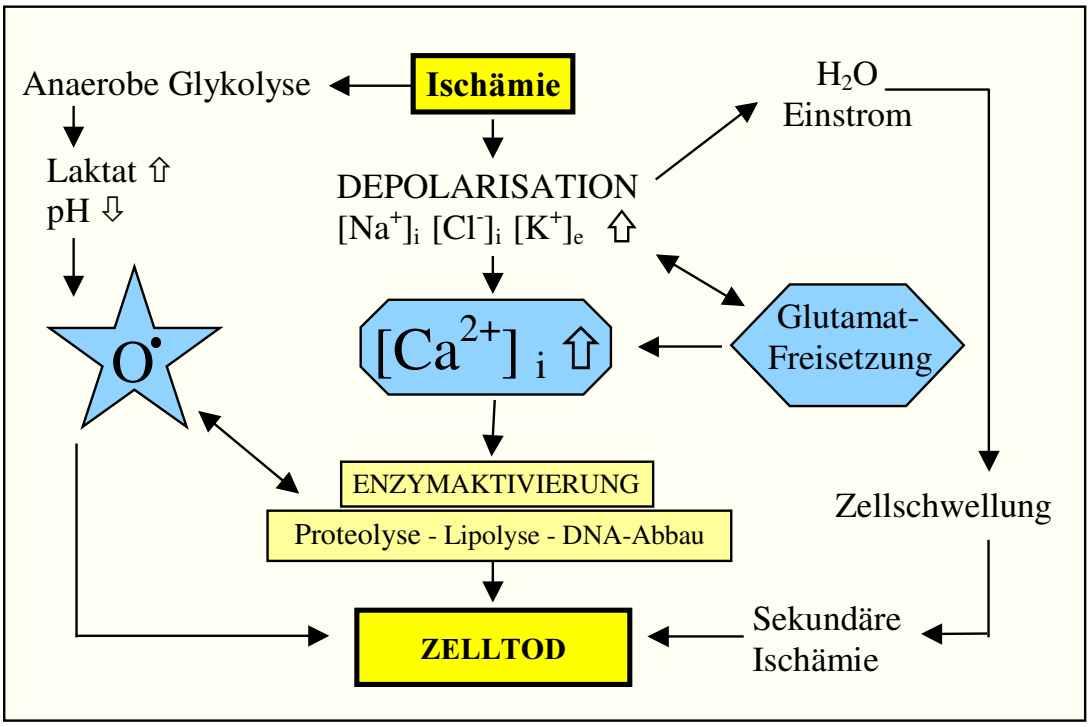

Abbildung 1: Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt durch Enzymaktivierung zur Proteolyse, Lipolyse und DNA-Fragmentierung. Der die Ionenverschiebung begleitende Einstrom von Wasser in die Zelle führt zur zellulären Schwellung und verstärkt die Ischämie. In direkter Folge des Energiemangels kommt es zu einer Störung der Wiederaufnahme von Glutamat. Gleichzeitig führt die Depolarisation zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat. Die Akkumulation von Glutamat im Extrazellularraum ist eine wesentliche Ursache für den exzessiven Einstrom von Ca^{2+}-Ionen. Im weiteren Verlauf der Ischämie kann ATP nur noch auf anaerobem Stoffwechselweg generiert werden, einhergehend mit der Produktion von Laktat und einer Gewebsazidose. Diese begünstigt die Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus intrazellulären Speichern und die Bildung freier Radikale. Abgesehen von ihrer direkt zytotoxischen Wirkung führen freie Radikale zur Lipidperoxidation, schädigen die DNA und Strukturproteine und initiieren über die weitere Freisetzung von Glutamat einen Circulus vitiosus.

1.3.3.1 Exzitotoxische Wirkung von Neurotransmittern

Der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter, Glutamat, ist gleichzeitig ein starkes Neurotoxin. Nach der Exzitotoxin-Hypothese wird der ischämiebedingte, neuronale Zelluntergang durch eine toxische Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum (EZR) ausgelöst.

Unter ischämischen Bedingungen wird Glutamat durch die neuronale Depolarisation vermehrt an Synapsen freigesetzt.[121] Infolge des Energiemangels kann Glutamat jedoch von Gliazellen und Neuronen (z.B. in Synaptosomen) nicht mehr aufgenommen werden.[292] Die Kombination dieser und anderer Faktoren führt somit zu einem massiven Anstieg von Glutamat im EZR während der Ischämie.[27;97] Glutamat und andere exzitatorische Aminosäuren wirken auf verschiedene Rezeptortypen im zentralen Nervensystem, stimulieren postsynaptische Neurone und können diese dadurch in eine katabole Stoffwechsellage versetzen. Mehrere Subtypen von Glutamatrezeptoren wurden in den letzten Jahren beschrieben. Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) und die Non-NMDA-Rezeptoren (AMPA/Quisqualat- und Kainat-Rezeptoren) sind mit einem Kationen-Kanal assoziiert, während der sogenannte metabotropische Non-NMDA-Rezeptor ein Second-messenger-System aktiviert (s. **Abbildung 2**).

Die molekularen Mechanismen dieser Neurotoxizität sind noch nicht genau bekannt. Untersuchungen an Zellkulturen haben gezeigt, dass hohe Glutamatkonzentrationen zwei verschiedene Reaktionen hervorrufen können: (a) eine akute Schwellung von Neuronen in Abhängigkeit von der extrazellulären Natriumkonzentration und (b) eine spätere neuronale Desintegration in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration.[48] Während Na^+-Ionen durch jeden Kationen-Kanal im aktivierten Zustand - insbesondere durch den AMPA-Rezeptor-assoziierten Kanal - in die Zelle einströmen, hat nur der NMDA-rezeptorabhängige Kanal eine hohe Permeabilität für Ca^{2+}-Ionen.[186] Insbesondere diesem NMDA-Rezeptor wird eine außerordentliche pathophysiologische Bedeutung zugeschrieben. Es wurde u.a. durch Autoradiographieuntersuchungen gezeigt, dass der NMDA-Rezeptor speziell in den selektiv vulnerablen Hirnarealen in hoher Konzentration vorkommt. Der Rezeptor-Kanal-Komplex besitzt einen spannungsabhängigen Magnesiumblock, und benötigt Glycin als Koagonist. Vordepolarisierte Neurone - z.B. infolge Glutamataktivierung des AMPA-Rezeptors - reagieren nach Entweichen des Magnesiumblocks mit einer erhöhten Öffnungsfrequenz des Kanals für Kalziumionen.[228] Die Stimulation des metabotropischen

Glutamatrezeptors führt ferner durch Anstoßen der Inositoltriphosphat-Kaskade zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Der massive Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration bewirkt schließlich die Aktivierung verschiedener Prozesse, die den Zelltod verursachen.[2]

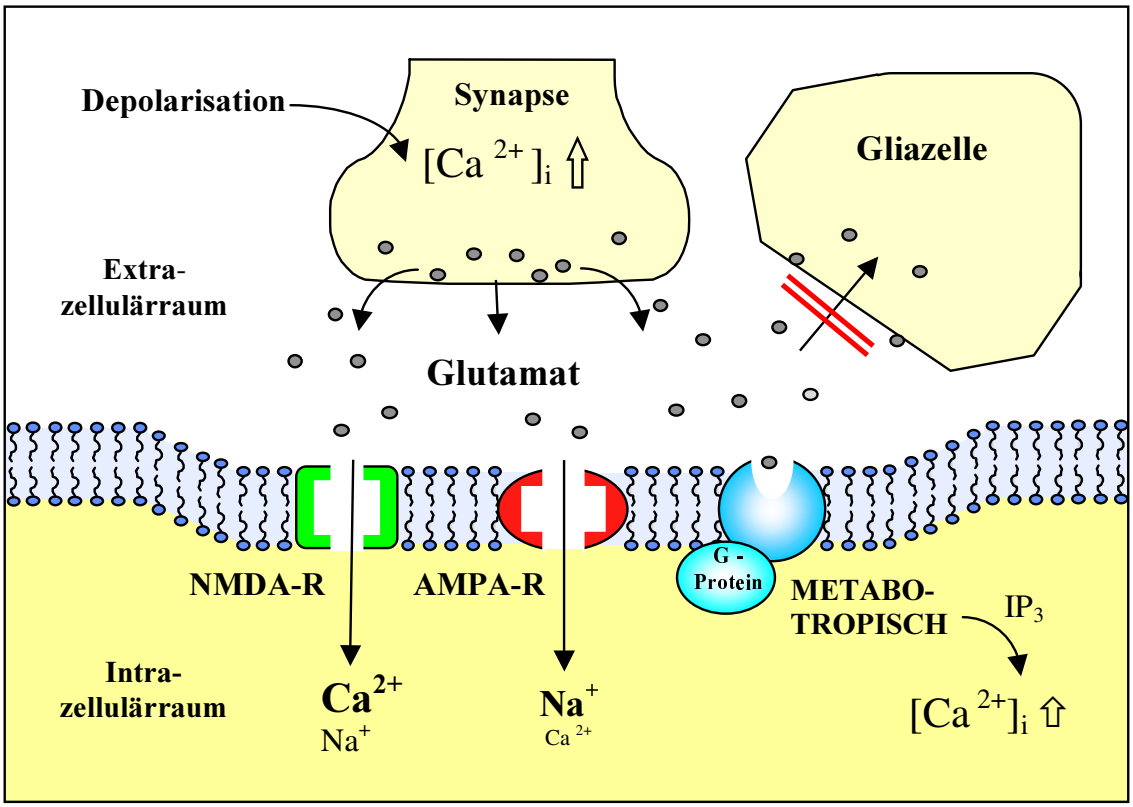

Abbildung 2: Infolge des Energiemangels kommt es zu einer Wiederaufnahmestörung für Glutamat. Gleichzeitig führt die Depolarisation zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat. Die Akkumulation von Glutamat im Extrazellularraum ist eine wesentliche Ursache für den exzessiven Einstrom von Ca^{2+}-Ionen durch Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren. Die Aktivierung des mit G-Proteinen gekoppelten, metabotropischen Glutamatrezeptors führt zur Öffnung von intrazellulären Kalziumspeichern über Phospholipase-C-Aktivierung und Erhöhung von Inositoltriphosphat (IP_3).

1.3.3.2 Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration

Neurone benötigen metabolische Energie, um die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration niedrig zu halten. Die physiologische intrazelluläre Konzentration von Kalzium liegt etwa 3 Größenordnungen unter der extrazellulären Konzentration. Für diesen Zweck werden Ca^{2+}-Ionen in intrazelluläre Speicher sequestriert oder aus der Zelle transportiert. Im energetischen Versagen während oder nach einer Ischämie kann die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration auf ein Vielfaches der physiologischen Konzentration ansteigen. Ca^{2+}-Ionen können durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle (voltage sensitive cation channel = VSCC), rezeptor-gesteuerte Ca^{2+}-Kanäle (receptor operated cation channel = ROCC) und nichtselektive Kationenkanäle (non selective cation channel = NSCC) in das Neuron einströmen (s. **Abbildung 3**).

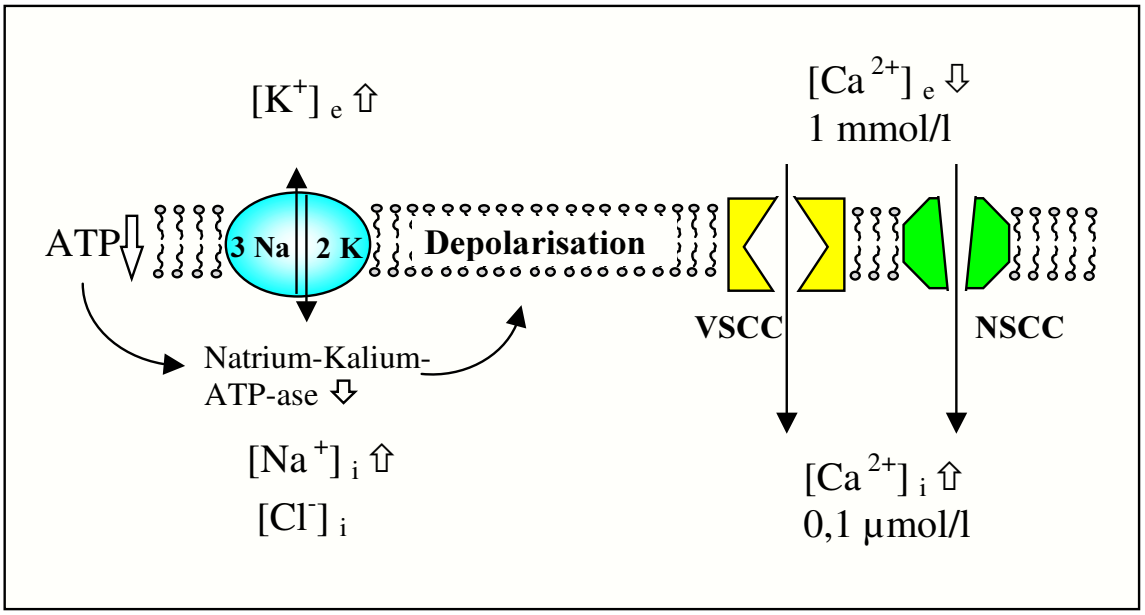

Abbildung 3: Im Energiemangelzustand kommt es zum Zusammenbruch der Ionengradienten mit konsekutiver Membrandepolarisation. Im Anschluss kommt es über eine Reihe von Ionenkanälen, unter anderem über spannungsabhängige Kalziumkanäle (VSCC) und über nichtselektive Kationenkanäle (NSCC) zum Einstrom von Kalziumionen.

Bei Energiemangel können sie auch durch einen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher in die Zelle gelangen. Zudem ist der energieabhängige Ca^{2+}-Auswärtstransport und die Speicherung im endoplasmatischen Retikulum gestört. Mitochondrien nehmen unter diesen Bedingungen zwar vermehrt Ca^{2+}-Ionen auf, können aber den durch die Ischämie hervorgerufenen Ca^{2+}-Einstrom nicht kompensieren. Zudem belastet die mitochondriale Ca^{2+}-Akkumulation ihre ATP-Synthese. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration löst eine Reihe von Reaktionen aus, die zur irreversiblen Schädigung des Neurons führen. Es kommt zu einer vermehrten Freisetzung von exzitatorischen Transmittern, zur Aktivierung von Phospholipasen, Proteasen, Endonukleasen und freien Sauerstoffradikalen sowie zur Störung des Energie- und Elektrolytstoffwechsels**.**

1.3.3.3 Bildung von freien Sauerstoffradikalen

Freie Radikale sind hochreaktive Sauerstoffmoleküle mit einem freien ungepaarten Elektron. Physiologischerweise entstehen sie als Intermediärsubstrate in der Atmungskette. Die vermehrte Bildung von freien Sauerstoffradikalen in der Reoxygenierungsphase nach Ischämie wird seit langem als wichtiger pathophysiologischer Vorgang angesehen.[60] Allerdings ist die Bildung sowie die Zerstörung dieser reaktiven Sauerstoffverbindungen in vivo schwer nachweisbar. Es besteht jedoch kein Zweifel, dass Radikale entstehen und dass sie für Zellmembranen und -organellen toxisch sind.[324] Die pathophysiologisch wichtigsten Radikale sind das Superoxid-Anion (O_2-*) und das Hydroxyl-Radikal (OH*). Einen wichtigen Entstehungsfaktor stellt u.a. die Gewebsazidose in ischämischen Arealen dar. Im sauren Mileau wird zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) - normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommend - gebildet, welches als Katalysator verschiedener Reaktionen, die zur Bildung von Radikalen beitragen, fungiert.[102] Freie Radikale attackieren vor allem Membranphospholipide und induzieren die Lipidperoxidation (s. **Abbildung 4**). Diese läuft als Kettenreaktion an den Membranen ab und führt zu irreversiblen Membranschädigungen und setzt Fettsäuren frei, z.B. Arachidonsäure.[319] Im Rahmen der Autoxidation von Arachidonsäure entstehen erneut Radikale, aber auch Thromboxane und Prostaglandine, welche die Zelle zusätzlich schädigen, und die bestehende Zirkulationsstörung verstärken. Ferner attackieren freie Sauerstoffradikale die DNA sowie Proteine, so dass sowohl die

Struktur und Funktion von Membranen, Rezeptoren, Ionenkanälen und Enzymen beeinträchtigt wird.[287]

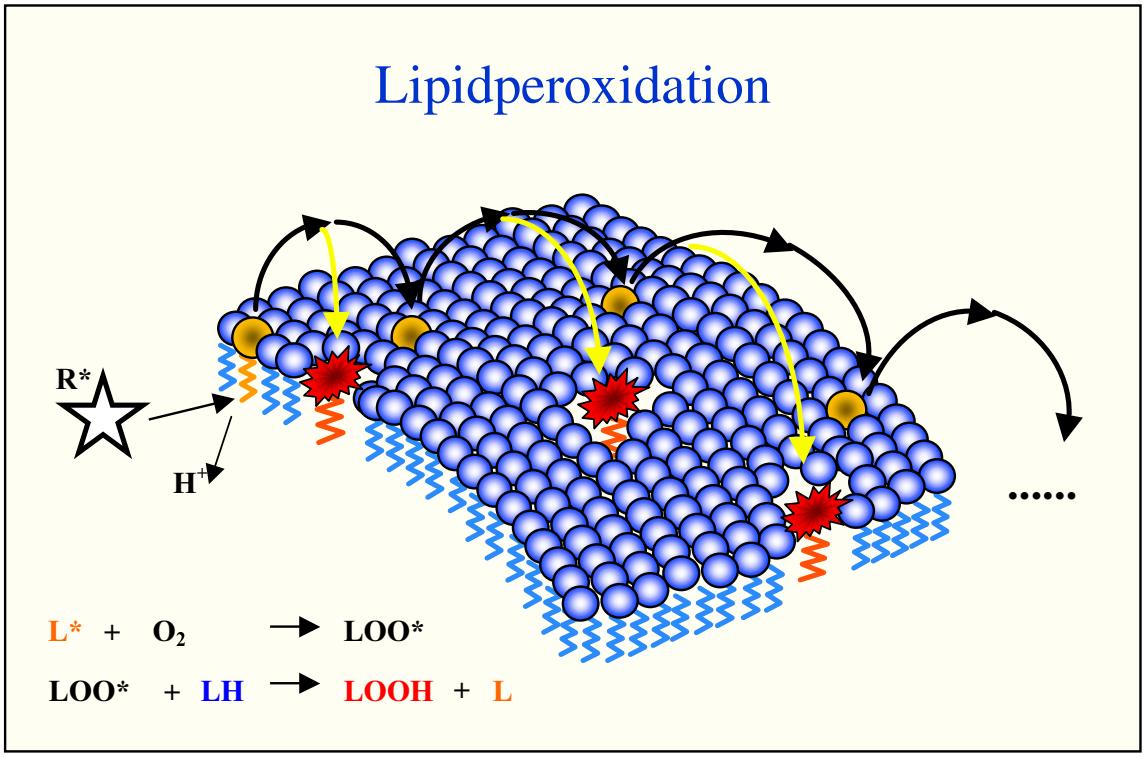

Abbildung 4: Lipidperoxidation und ihre Hemmung durch Tirilazad

Ein Sauerstoffradikal (**R***) greift eine Doppelbindung in einer ungesättigten Fettsäure (**LH**) an, entfernt ein Wasserstoffatom (H^+) aus der Seitenkette und erzeugt so ein Acylradikal (**L***). Dieses reagiert mit einem Sauerstoffmolekül ($\mathbf{O_2}$) zu einem Peroxiacylradikal (**LOO***). Das Peroxiacylradikal reagiert mit einer weiteren Fettsäure (**LH**) und erzeugt ein Hydroperoxiacylradikal (**LOOH**) und ein weiteres Acylradikal. Es kommt schließlich zu einer Kettenreaktion und die Zellmembran wird zerstört.

1.4 Möglichkeiten der Pharmakotherapie

Die dargestellten pathophysiologischen Mechanismen eignen sich für einen Eingriff durch Pharmaka, um das Neuron vor der ischämischen Schädigung zu schützen. Andererseits wird deutlich, dass ein einzelner Wirkstoff nicht alle Vorgänge bei der Zellschädigung verhindern kann. Kalzium-Antagonisten, Glutamat-Antagonisten und Sauerstoffradikalfänger bieten Möglichkeiten, woraus sich klinisch wirksame therapeutische Methoden einer zerebralen Protektion entwickeln lassen könnten.

Das Stufenschema der Schmerztherapie, bei welchem durch pharmakologisches Angreifen an verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen ein synergistischer schmerztherapeutischer Effekt erreicht werden kann, ist ein klassisches Beispiel für die Wirksamkeit der kombinierten Anwendung verschiedener Pharmaka. Aufgrund der Komplexität der pathophysiologischen Vorgänge bei zerebraler Ischämie bieten sich eine Reihe von Ansatzpunkten, in die Kaskade der neuronalen Zellschädigung einzugreifen. Mit besser werdendem Verständnis der durch zerebrale Ischämie ausgelösten pathophysiologischen Mechanismen wurden zunehmend wirksamere Pharmaka mit unterschiedlichen Wirkmechanismen entwickelt. Im Tierexperiment kann durch verschiedene Wirkstoffe eine Reduktion der Infarktgröße oder eine Protektion von Neuronen erzielt werden. Durch einen „Cocktail" könnten evtl. (a) die Durchblutung verbessert, (b) der intrazelluläre Ca^{2+}-Einstrom gehemmt, (c) exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat antagonisiert werden und (d) die Bildung freier Sauerstoffradikale vermindert werden.

1.4.1 Antagonisten der exzitatorischen Aminosäuren

1.4.1.1 Hemmung der präsynaptischen Freisetzung

Der Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration ist u.a. wahrscheinlich Folge des Versagens und schließlich Umkehr des energieabhängigen, an den Natriumflux gekoppelten Glutamat-Transports.[184] Als protektiver Wirkmechanismus ist daher eine präsynaptische Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle denkbar.[92] Untersuchungen mit Natriumkanalblockern, wie Derivate von Folsäureantagonisten (z.B. Lamotrigin) oder die Benzothiazole Riluzole und Lubeluzole, konnten eine neuroprotektive Wirkung bestätigen.[312] Aufgrund deren Wirkung auf die Freisetzung von Glutamat werden diese Substanzen auch als „Glutamate Release Inhibitors" bezeichnet.

Lubeluzole scheint ein multifaktoriell wirksames Medikament zu sein. Zusätzlich zur Reduktion der Glutamatfreisetzung wurde eine intrazelluläre Hemmung der durch Glutamat induzierten neurotoxischen Wirkung von Stickoxid (NO) nachgewiesen.[177] Die Substanz erwies sich im Tierexperiment auch noch bei Gabe bis zu 6 Stunden nach Ischämiebeginn in verschiedenen Modellen der fokalen Ischämie protektiv.[8;59] In einer klinischen Phase II Studie konnte durch Lubeluzole die Mortalität gesenkt werden.[63] Kürzlich wurden Phase III Studien durchgeführt, in denen Lubeluzole die neurologische Symptomatik bei Schlaganfallpatienten

verbesserte, ohne intolerable Nebenwirkungen zu zeigen.[328] Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse konnte der Wirkstoff in einer klinischen Doppelblindstudie das neuroprotektive Potential jedoch nicht bestätigen.[62]

1.4.1.2 NMDA-Rezeptor-Antagonisten

Die Fähigkeit von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die ischämische Hirnschädigung zu vermindern, wurde in Katzen- und Nagetiermodellen der fokalen zerebralen Ischämie geprüft. Die Blockade von NMDA-Rezeptoren scheint einen protektiven Effekt auf Neurone im Kortex und Hippokampus nur dann auszuüben, wenn der ischämische Insult inkomplett ist.[2]

Nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Dizocilpin (MK-801), die den rezeptorregulierten Ca^{2+}-Ionenkanal (ROCC) blockieren, verringern deutlich (um mehr als 50%) einen ischämischen Infarkt, wenn die Verabreichung vor der Ischämie oder bis 2h nach der Ischämie erfolgt.[236] Kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Selfotel oder Eliprodil, die an der Neurotransmitter-Bindungsstelle wirksam sind, reduzieren eine ischämische Hirnschädigung am wirksamsten, wenn die Verabreichung vor der ischämischen Episode erfolgt.[293] Jedoch wurden unerwünschte psychomimetische Nebenwirkungen sowohl bei nicht-kompetitiven als auch bei kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten beobachtet.[214] Man nimmt an, dass durch die Rezeptorblockade auch die physiologischen Funktionen von Neurotransmittern gehemmt werden. Diese Nebenwirkungen machen einen klinischen Einsatz von vielen NMDA-Antagonisten unwahrscheinlich.

Steinberg und Mitarbeiter zeigten, dass ein weitverbreitetes Antitussivum, Dextromethorphan, auch als nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist wirksam ist.[303] Zusätzlich wirkt Dextromethorphan antikonvulsiv und blockiert spannungsabhängige Kalziumkanäle (VSCC).[39] Im Gegensatz zu den bisher erwähnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten erwiesen sich die Nebenwirkungen von Dextromethorphan in einer Dosisfindungsstudie bei neurochirurgischen Patienten als tolerabel und reversibel.[301] Dextromethorphan könnte somit auch für Schlaganfallpatienten oder während temporärer Unterbindung von Hirnarterien von therapeutischer Bedeutung sein.

1.4.1.3 Non-NMDA-Rezeptor-Antagonisten

Es konnte eine ausgeprägte neuroprotektive Wirkung durch Non-NMDA-Rezeptorenblockern bei der fokalen Ischämie[34] und globalen Ischämie[279] beobachtet werden. NBQX, ein AMPA/-Quisqualat-Rezeptorenblocker, vermindert den Zelluntergang im Hippokampus um 44-69% nach schwerer globaler Ischämie, während NMDA-Antagonisten keine Wirkung zeigten.[224] Judge und Mitarbeiter konnten die protektive Wirkung von NBQX auch bei Applikation nach dem ischämischen Insult nachweisen.[139] Die Mechanismen, wodurch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren durch Glutamat zum Zellschaden beitragen, sind nicht bekannt. Nellgard und Wieloch vermuten, dass Ischämie die Empfindlichkeit vulnerabler Neurone gegenüber AMPA-vermittelter Glutamatwirkung verstärkt.[224] Da der größte Teil der exzitatorischen Erregungsübertragung im Gehirn über AMPA-Rezeptoren vermittelt wird, sind sorgfältige Untersuchungen hinsichtlich unerwünschter Nebenwirkungen von AMPA-Antagonisten erforderlich. Kürzlich wurden klinische Studien mit NBQX aufgrund von Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität und Beeinflussung des Glucosemetabolismus abgebrochen.[86]

Die überlegene zerebroprotektive Wirkung von Non-NMDA- als auch von NMDA-Rezeptorenblockern rechtfertigt jedoch weitere Untersuchungen, um die Nebenwirkungen dem erwarteten Nutzen gegenüberstellen zu können.

1.4.2 Kalziumantagonisten

Bei zerebraler Ischämie tritt vermutlich als zentraler Mechanismus des Zelltods eine intrazelluläre Kalziumakkumulation auf. Pharmakologischer Antagonismus des Ca^{2+}-Einstroms in die Nervenzelle hat somit therapeutischen Wert. Außerdem können Kalzium-Antagonisten den zerebralen Blutfluss verbessern.[69;199]

Im Gegensatz zu den gängigen Kalziumkanalblockern, die zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen entwickelt wurden, sind Antagonisten der Dihydropyridin-Gruppe lipophil. Sie überwinden die Blut-Hirn-Schranke und können dadurch an neuronalen VSCC vom L-Typ ihre Wirkung entfalten. Die meisten klinischen Untersuchungen liegen über Nimodipin vor. So wurde gezeigt, dass Nimodipin die Ausprägung eines Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung (SAB) vermindert bzw. das klinische Outcome verbessert.[231]

Nimodipin wird deshalb seit etwa zehn Jahren in der Behandlung von Patienten mit SAB eingesetzt. Es konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden, dass Kalzium-Antagonisten auch bei akutem Verschluss einer Hirnarterie (Schlaganfall, neurochirurgische Operation) neurologische Ausfälle verhindern.[84;109] Beim Einsatz von Nimodipin nach Schlaganfall wurde sogar von erhöhter Mortalität berichtet, weshalb klinische Studien abgebrochen wurden.[153] Ursächlich für die enttäuschenden Ergebnisse könnten u.a. Auswirkungen auf den arteriellen Blutdruck sein. Durch die Vasodilatation tritt bei vielen Patienten ein Blutdruckabfall auf.

Magnesium, ein physiologischer Kalziumantagonist, reguliert Gefäßtonus und Zellmembranfunktionen. Es besitzt potentiell neuroprotektive Wirkmechanismen, welche vielfältig und noch nicht gänzlich geklärt sind. Magnesiumionen blockieren spannungsabhängig den NMDA-Rezeptor-Ionenkanal und verhalten sich pharmakologisch wie nichtkompetitive NMDA-Antagonisten.[133;228] An der Zellmembran wird der Kalziumeinstrom sowohl an VSCC als auch ROCC gehemmt.[5] Ferner gibt es Hinweise, dass Magnesium die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca^{2+}-Ionen sowie von exzitatorischen Aminosäuren hemmt.[85;125] Im Tierexperiment erwies sich Magnesium protektiv, indem es die Mortalität und funktionellen Defizite sowohl bei fokaler[189] als auch globaler Ischämie,[321] bei Schädel-Hirn-Trauma,[194] SAB[249] und Rückenmarksverletzungen reduzierte.[253] Magnesium besitzt zudem den Vorteil, dass es für den Einsatz am Patienten zugelassen ist. In einer Pilotstudie mit Schlaganfallpatienten wurde Magnesium gut toleriert und war nebenwirkungsarm.[213] Im Rahmen der IMAGES-Studie (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke) wird die Wirksamkeit von Magnesium nach Schlaganfall derzeit klinisch geprüft.

1.4.3 Sauerstoffradikalfänger

1.4.3.1 Endogene Antioxidantien

Zellen können Sauerstoffradikale durch Enzyme (Superoxid Dismutase [SOD], Peroxidasen, Katalasen) und natürliche Radikalfänger (Vitamin C und E) beseitigen. Die Funktion der zelleigenen Systeme ist jedoch von einer normalen Stoffwechselleistung abhängig. Wenn in der Penumbrazone einer fokalen Ischämie oder in der Rezirkulationsphase nach globaler Ischämie vermehrt Sauerstoffradikale (Superoxid-Anion O_2-*, Hydroxyl-Radikal OH*) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) akkumulieren, sind diese Abwehrmechanismen

jedoch beeinträchtigt und schnell erschöpft.[289] In tierexperimentellen Studien zeigte sich, dass nach hochdosierter Verabreichung von Vitamin E die Folgeprodukte der durch Sauerstoff-radikale induzierten Lipidperoxidation im neuronalen Gewebe signifikant vermindert waren.[156] Vitamin C konnte im Tierversuch bei fokal reversibler zerebraler Ischämie u.a. am Primaten das Infarktvolumen signifikant verringern.[117] Die langsame Akkumulation von Vitamin E im Hirnparenchym macht jedoch eine länger dauernde Verabreichung notwendig, so dass die Anwendung von Vitamin E im Rahmen einer akuten zerebralen Ischämie wenig erfolgversprechend ist.[108]

Das Enzym SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Durch die Verabreichung von SOD versprach man sich die endogenen antioxidativen Systeme zu unterstützen. Experimentelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass nur durch sehr hohe Konzentrationen eine Protektion erreicht werden konnte.[191] Dies liegt u.a. an der sehr kurzen Plasma-Halbwertszeit von nur 6-10 Minuten.[229;241] Ferner ist SOD ein wasserlösliches Protein, das die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden kann.[41]

1.4.3.2 Synthetische Antioxidantien

Um das Eindringen von SOD in die Zellen zu erleichtern und die Halbwertszeit zu verlängern wurde das Enzym mit Polyethylen-Glykol (PEG-SOD) konjugiert oder in Liposomen eingeschlossen.[41;132;333] Die zerebroprotektive Wirkung von intravenös verabreichter PEG-SOD konnte bei fokaler[239] und globaler[324] zerebraler Ischämie nachgewiesen werden. Obwohl eine klinische Phase II Studie mit PEG-SOD bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma vielversprechende Resultate erbrachte,[216] konnte eine nachfolgende Phase III Studie diese Ergebnisse nicht bestätigen.[335]

Hall und Mitarbeiter beschrieben eine im Vergleich zu Vitamin E bis 100-fach stärkere antioxidative Wirkung durch 21-Aminosteroide,[105;107] z.B. Tirilazad mesylate (U-74006F). Die Wirksamkeit einer prä- und postischämischen Behandlung mit 21-Aminosteroiden ist bei fokaler[107;235] und globaler[178;240] zerebraler Ischämie tierexperimentell nachgewiesen. 21-Aminosteroide oder Lazaroide sind potente Inhibitoren der durch freie Sauerstoffradikale induzierten, sowie Eisen-katalysierten Lipidperoxidation.[103] Aufgrund der steroidalen Molekülstruktur (s. **Abbildung 5**), beschränkt sich die Wirksamkeit dieser Stoffklasse hauptsächlich auf das Gefäßendothel, da sich das Molekül in die Endothelmembranen einlagert, und eine Passage der Blut-Hirn-Schranke nur in geringem Maße möglich ist.

Tirilazad wurde kürzlich für den klinischen Einsatz zugelassen.[151] In einer internationalen Multicenter-Studie in Europa, Australien und Neuseeland an Patienten mit schwerer Subarachnoidalblutung bewirkte es eine Verbesserung des Outcomes, jedoch nur bei männlichen Patienten.[151] Bei weiblichen Patienten erwies sich Tirilazad in der angewandten Dosierung als wirkungslos. Man vermutete, dass eine schnellere Verstoffwechslung des Medikaments bei Frauen die Wirksamkeit vermindert.[160] In einer Studie bei Schlaganfall-Patienten zeigte Tirilazad ebenfalls keine Wirkung, weshalb Untersuchungen mit höheren Dosierungen angestrebt wurden.[160;276] In einer Multicenter-Studie an Patienten mit SAB konnte schließlich mit höherer Dosierung auch bei Frauen eine signifikante Reduktion der Mortalität gezeigt werden.[172] Der protektive Effekt war vor allem bei Patienten mit ausgeprägten neurologischen Defiziten nachweisbar. Eine weitere Studie konnte zwar keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Mortalität zeigen, fand aber eine geringere Inzidenz des Vasospasmus nach SAB.[173] Eine Untersuchung an Patienten mit SAB, die mit Tirilazad im Rahmen einer weiteren Multicenter-Studie behandelt wurden, ergab ferner, dass bei diesen zwar keine Reduktion der Mortalität zu erreichen war, im weiteren Verlauf jedoch hinsichtlich Psychomotorik, Konzentrationsfähigkeit sowie Müdigkeit eine Verbesserung eintrat.[230]

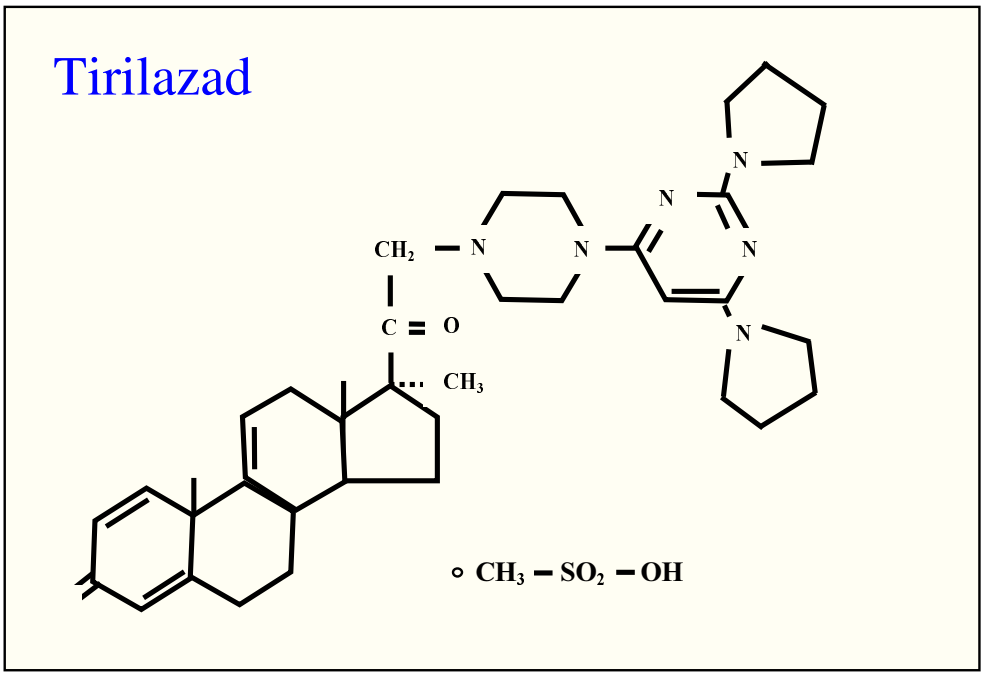

Abbildung 5: Die Strukturformel von Tirilazad.

Die strukturelle Verwandtschaft zu den Membranlipiden ermöglicht dem Aminosteroid die Akkumulation in den Zellmembranen.

Es mehren sich die Hinweise, dass lipophile Antioxidantien, welche die intakte Blut-Hirn-Schranke besser überwinden können, als z.B. 21-Aminosteroide, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber der oxidativen Schädigung durch Sauerstoffradikale besitzen.[221;266;319] Diese Antioxidantien scheinen zum Teil auch in die Mitochondrien zu penetrieren, und die Enzyme der Atmungskette vor Oxidation zu schützen.[221]

Das sogenannte „spin trapping agent“ PBN (Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone) wird zum Nachweis von Sauerstoffradikalen verwendet, da es mit ihnen Komplexe bildet, welche im Kernspintomogramm nachweisbar sind.[42] Gleichzeitig besitzt die Substanz durch diese Komplexbildung Radikalfänger-Eigenschaften, sie überwindet die Blut-Hirn-Schranke und scheint ein ungewöhnlich langes therapeutisches Fenster zu besitzen.[37] Schulz und Mitarbeiter konnten im direkten Vergleich zu NMDA-Antagonisten sowie zu „Glutamate Release Inhibitoren“ ein um Stunden verlängertes therapeutisches Fenster nachweisen.[274] In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte durch PBN jedoch keine signifikante Reduktion des Infarktvolumens erreicht werden.[263]

1.5 Zerebroprotektive Pharmaka in der Neurochirurgie

Im klinischen Alltag werden während neurochirurgischer Eingriffe standardmäßig eine Reihe von Medikamenten verabreicht, die potentiell neuroprotektiv wirksam sind. Der wissenschaftliche Beweis ihrer Wirksamkeit für Menschen ist jedoch ausstehend.

1.5.1 Anästhetika

Barbiturate, verabreicht in „burst-suppression“-Dosierung, gelten bis heute als Goldstandard der Zerebroprotektion. Pentobarbital und Thiopental entfalten ihre protektive Wirkung vor allem bei der regionalen zerebralen Ischämie. Diese neuroprotektive Wirksamkeit der Barbiturate konnte in tierexperimentellen Studien bewiesen werden, beim Menschen gibt es lediglich Hinweise darauf.[201;296-298]

Bezüglich des Wirkungsmechanismus wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Barbiturate modulieren die Wirkung des GABA-Rezeptors, hemmen somit den Stoffwechsel von Neuronen und reduzieren die zerebrale elektrische Aktivität.[152] Zusätzlich wird die Durchblutung in ischämischen Arealen verbessert (umgekehrtes Steal-Phänomen). Barbiturate heben den Sauerstoffgehalt im Gewebe durch Verbesserung der Mikrozirkulation und durch

Senkung des intrakraniellen Drucks. Ferner gibt es Hinweise, dass Barbiturate die Freisetzung freier Fettsäuren vermindern und freie Radikale inaktivieren.[29;222;281] Der klinische Wert hinsichtlich dadurch verbesserter Operationsergebnisse ist jedoch schwierig zu beurteilen. Es kann nicht mit letzter Sicherheit entschieden werden, ob postoperative neurologische Ausfälle durch den Einsatz von Barbituraten vermieden wurden oder ob sie bei den individuellen Patienten auch ohne Barbiturate nicht oder in abgeschwächter Form aufgetreten wären. Auch ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob die Barbiturate in „burst-suppression"-Dosierung anzuwenden sind, oder ob bereits in niedrigeren Dosierungen eine maximale Neuroprotektion zu erreichen ist. Im Tierexperiment konnten wir zeigen, dass bereits in niedrigeren Dosierungen eine vergleichbare neuroprotektive Wirkung zu erzielen ist.[265] Auch die Frage, ob Isofluran eine bessere protektive Wirksamkeit besitzt ist letztendlich nicht völlig geklärt. Diesbezügliche Untersuchungen an Primaten lieferten keine übereinstimmenden Ergebnisse. Nehls und Mitarbeiter[223] sowie die Arbeitsgruppe um Milde[203] demonstrierten bei der fokalen Ischämie, dass Isofluran im Vergleich zu Barbituraten allenfalls gleich oder sogar weniger wirksam ist.

1.5.2 Nimodipin

Nimodipin wird seit ca. 10 Jahren in der Behandlung von Patienten mit SAB eingesetzt. In kontrollierten klinischen Studien konnte eine Reduktion der Mortalität und Morbidität durch Vasospasmus nachgewiesen werden.[72;137;231] Die Wirksamkeit von Kalziumantagonisten bei Patienten mit akutem Gefäßverschluss konnte nicht bewiesen werden.[83;84;116] Es ist jedoch anzumerken, dass in diesen klinischen Studien lediglich 3-4% der Patienten innerhalb von sechs Stunden nach Auftreten der Symptome behandelt wurden.[208]

1.5.3 Mannitol

Mannitol reduziert durch seinen osmotischen Effekt das Hirnödem und senkt den intrakraniellen Druck (ICP).[181;280;311] Insbesondere wegen seiner entwässernden Wirkung auf das Gehirn wird es bei neurochirurgischen Eingriffen eingesetzt, um durch die Volumenreduktion das Erreichen tieferer Strukturen zu erleichtern. Ferner verbessert es die zerebrale Durchblutung unter experimentellen und klinischen Bedingungen. Die Wirkung

beruht unter anderem auf einer Verminderung der Blutviskosität und auf der Verbesserung der Mikrozirkulation.[136;200;278] Zusätzlich scheint Mannitol das „No-Reflow"-Phänomen zu verhindern und Radikalfänger-Eigenschaften zu besitzen.[187;207]

1.5.4 Kortikosteroide

Kortikosteroide können die Folgen einer zerebralen Ischämie durch verschiedene Mechanismen beeinflussen. Kortikosteroide stimulieren die Gen-Expression von Zellen und induzieren dadurch Proteine, welche die Phospholipase A2 hemmen. Der Abbau von Membran-Phospholipiden und die Entstehung freier Fettsäuren werden dadurch unterdrückt.[109] Außerdem sollen sie als Radikalfänger die Lipidperoxidation hemmen.[323] Aufgrund der positiven Wirkung auf die perifokale Hirnschwellung (Verminderung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke) wird Dexamethason bei fast allen operativen Eingriffen am Gehirn eingesetzt. Die Wirksamkeit von Kortikosteroiden bei zerebraler Ischämie ist allerdings sehr umstritten.[1;43;250;261]

1.5.5 „Sendai-Cocktail"

Eine Gruppe aus Sendai, Japan, berichtete durch Verabreichung einer Kombination von Pharmaka („Sendai-Cocktail I": 20% Mannitol 500 ml, Vitamin E 300 mg, Dexamethason 50 mg) das Risiko einer temporären Okklusion einer Hirnarterie gesenkt zu haben.[334] Später wurde der „Sendai-Cocktail" modifiziert eingesetzt, bestehend aus 20% Mannitol 100 ml, Vitamin E 30 mg/kg und Phenytoin 10-30 mg/kg. Die Pharmaka wurden unter experimentellen Bedingungen vorwiegend als Monotherapie getestet. Untersuchungen der Kombinationen in vitro zeigten eine Hemmung der durch freie Radikale verursachten Lipidperoxidation und positive Auswirkungen auf den zerebralen Stoffwechsel sowie auf den Elektrolyt- und Wassergehalt des Hirnparenchyms.[6;311;323] Die Wirksamkeit der Kombination in vivo stützt sich jedoch vorwiegend auf die Messung von EEG-Amplituden beim Hund als Ausdruck funktioneller Erholung drei Stunden nach einstündiger transienter globaler Ischämie.[310] In einer nicht randomisierten und nicht kontrollierten Studie an neurochirurgischen Patienten mit temporärem Gefäßverschluss folgerten die Autoren, dass eine Okklusion bis zu 20 Minuten bei gleichzeitiger Verabreichung dieser Wirkstoffe mit nur geringen Risiken verbunden sei.[131]

1.6 Hypothermie

Bereits vor 40 Jahren wurde die zerebroprotektive Wirkung von Hypothermie beschrieben und teilweise eingesetzt.[256] Aufgrund vermehrten Auftretens von Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen oder Koagulopathien wurde die Hypothermieanwendung jedoch wieder verlassen.[95] Nachdem Busto et al. 1987 im Tierexperiment zeigen konnten, dass bereits milde Hypothermie bei einer Absenkung der Kerntemperatur um 2-3°C vor den Folgen der zerebralen Ischämie schützt,[35;211] entwickelte sich neuer Enthusiasmus und es wurden zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt.[141;190;252]

Die protektive Wirksamkeit der Hypothermie scheint auf vielfältigen Mechanismen zu basieren. Hypothermie führt zu einer temperaturabhängigen Suppression des zerebralen Metabolismus indem der Struktur- und Funktionsstoffwechsel des zentralen Nervensystems reduziert wird.[198] Dadurch wird der Substratbedarf gesenkt und eine Mangelversorgung vermieden.[225] Ferner wurde gezeigt, dass Hypothermie die Blut-Hirn-Schranke stabilisiert,[65] die Freisetzung von Glutamat in den Extrazellulärraum vermindert[15;36;91] sowie die Bildung von freien Radikalen und Stickstoffmonoxid (NO) reduziert bzw. hemmt.[91;142] Außerdem scheint Hypothermie auch genetische Reparaturmechanismen der Zelle zu stimulieren. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Hypothermie im Gegensatz zu normothermen Bedingungen eine Erholung der Membranbiosynthese gewährleistet wird.[332] Analog zur neuroprotektiven Wirkung von Hypothermie verschlechtert eine erhöhte Temperatur das Outcome nach ischämischen Ereignissen.[169]

Aufgrund überzeugender experimenteller und klinischer Ergebnisse wird milde Hypothermie zunehmend zur Zerebroprotektion in der Neurochirurgie eingesetzt. Aus diesem Grunde soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob die Wirkung von Hypothermie durch eine Kombination von Pharmaka gesteigert werden kann.

1.7 Kombinierte Pharmakotherapie

Da die individuellen Wirkmechanismen der hier diskutierten, z.T. neuen Pharmaka im Vordergrund vieler Studien standen, wurden kontrollierte Untersuchungen mit einer kombinierten Pharmakotherapie bislang vernachlässigt. Angesichts der zahlreichen Faktoren, die additiv oder möglicherweise synergistisch am ischämischen Parenchymschaden beteiligt sind, erscheinen eine Reihe von kombinierten pharmakologischen Therapieansätzen sinnvoll.[127;264;271]

1.7.1 Glutamatantagonisten und Kalziumkanalblocker

Ein additiver Effekt konnte dabei für die Kombination eines nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten (MK-801) mit Kalziumkanalblockern (Nimodipin, Nicardipin) bei der fokalen[322] wie globalen Ischämie[118;254] nachgewiesen werden. Durch diese Kombinationen wurden gleichzeitig zwei Mechanismen des durch die Ischämie induzierten Ca^{2+}-Einstroms gehemmt. Während MK-801 den Ca^{2+}-Einstrom über rezeptorgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle (ROCC) blockiert, wird durch Nimodipin oder Nicardipin der Ca^{2+}-Einstrom über die spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanäle (VSCC) abgeschwächt. Gill und Woodruff demonstrierten am Gerbil bei globaler Ischämie eine verbesserte Wirkung bei Kombination von MK-801 und Kynurensäure.[88] Kynurensäure blockiert nicht-kompetitiv die Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptorkanal-Komplexes. Interessanterweise zeigten beide Pharmaka, sofern sie in niedriger Dosierung einzeln verabreicht wurden, keine Wirkung. In gleicher Dosierung bei kombinierter Anwendung wurde ein neuroprotektiver Effekt im Hippokampus beobachtet.

Der gleichzeitige Einsatz von NMDA-Rezeptor-Antagonisten und AMPA-Rezeptor-Antagonisten erzielte widersprüchliche Ergebnisse. Bei der fokalen Ischämie beobachteten Lippert und Mitarbeiter bei Mäusen einen synergistischen protektiven Effekt durch Behandlung mit MK-801 und NBQX.[180] Im Gegensatz dazu zeigten Gill und Lodge an der Ratte, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 alleine verabreicht wirksamer war als in Kombination mit NBQX.[87] Ferner scheint bei Katzen diese Medikamentenkombination atemdepressiv zu wirken.[77]

1.7.2 Glutamat-/Kalziumantagonisten und Sauerstoffradikalfänger

Ein vielversprechender neuroprotektiver Ansatz ist die kombinierte Therapie mit entweder Glutamat-Antagonisten oder Kalziumkanalblockern zusammen mit einem Sauerstoffradikalfänger. So verbesserte die gleichzeitige Gabe von PBN und MK-801 die Protektion in Zellkulturen des Hippokampus.[21] Davies und Mitarbeiter untersuchten bei globaler Ischämie am Hund, ob die Gabe des Eisen-Chelators und Sauerstoffradikalfängers Deferoxamin zusammen mit einem neuartigen NMDA-Rezeptor-Antagonisten (GPI 3000) einen verbesserten Schutz vor den ischämischen Schäden bewirkt. Die Kombination verminderte die postischämische zerebrale Hypoperfusion und die Erholung der Phosphokreatininspeicher war verbessert.[57] Im Gegensatz zu diesen positiven Beobachtungen blieb jedoch die Kombination von Nimodipin und PEG-SOD hinter den Erwartungen zurück. Deren Gabe blieb sowohl als Monotherapie als auch in Kombination bei neugeborenen Schweinen nach 30-minütiger Hypoxie wirkungslos.[174]

1.7.3 Hypothermie und medikamentöse Therapie

Eine Verbesserung der neuroprotektiven Wirkung von Hypothermie durch die Gabe des Kalziumantagonisten Magnesium wurde bereits 1984 von Vacanti und Ames an einem Modell der spinalen Ischämie belegt.[325] Ginsberg und Mitarbeiter zeigten in einem Modell der globalen Ischämie, dass die zerebroprotektive Wirkung von Hypothermie und Dextromethorphan, einem nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten, durch kombinierte Anwendung verstärkt wurde.[90] Shuaib et al. konnten das protektive Potential von Hypothermie durch die Verabreichung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Selfotel ebenfalls verbessern.[282]

Bei fokaler Ischämie an der Ratte konnte jedoch weder MK-801 noch Mannitol die Neuroprotektion durch milde Hypothermie steigern.[78;148] Unsere Arbeitsgruppe untersuchte, ob die neuroprotektive Wirksamkeit von Hypothermie durch die zusätzliche Anwendung von Barbituraten weiter gesteigert werden kann. Dabei fand sich eine überlegen Wirksamkeit von milder Hypothermie im Vergleich zu den Barbituraten, welche durch die kombinierte Anwendung nicht gesteigert werden konnte.[329] Da milde Hypothermie zunehmend klinisch eingesetzt wird, sollte die Überprüfung einer vielversprechenden pharmakologischen Kombinationstherapie sowohl im Vergleich als auch in Kombination mit Hypothermie vorgenommen werden.

1.8 Fragestellung

Ihm Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand ein komplexes pathophysiologisches Konzept der zerebralen Ischämie. Entsprechend dieser pathophysiologischen Grundlagen erscheint der Einsatz eines Wirkstoffs allein weniger erfolgversprechend als eine Kombination verschiedener protektiver Methoden. Es galt somit zwei Hypothesen zu überprüfen:

1. Kann durch den kombinierten Einsatz potentiell neuroprotektiver Medikamente deren Wirksamkeit im Vergleich zur Monotherapie gesteigert werden?

2. Kann die neuroprotektive Wirkung von Hypothermie durch eine zusätzlich verabreichte Medikamentenkombination gesteigert werden?

Um eine Umsetzung der experimentellen Ergebnisse in die klinische Praxis zu ermöglichen, sollten für diese Arbeit Pharmaka verwendet werden, die bereits für den Einsatz am Menschen zugelassen sind. Außer den in der Neurochirurgie verwendeten Basistherapeutika (s. Kap. 2.3) erfüllen derzeit jedoch nur wenige Medikamente diese Anforderungen. Entsprechend dem pathophysiologischen Konzept mit den Hauptmechanismen - Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren, Kalziumeinstrom in die Zelle und Bildung von Sauerstoffradikalen - boten sich für die Versuche das Antioxidans Tirilazad (s. Kap. 2.2.3.2), der physiologische Kalziumantagonist Magnesium (s. Kap. 2.2.2) sowie der NMDA-Antagonist Dextromethorphan (s. Kap. 2.2.1.2) an.

Material und Methoden

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern in München vorgenommen. In den letzten Jahren wurde von unserer Arbeitsgruppe am Institut ein weitverbreitetes Modell zur Induktion einer reversiblen fokalen zerebralen Ischämie an der Ratte etabliert. Dieses sogenannte "Fadenmodell" diente für die vorliegenden Untersuchungen. Im Rahmen der Fragestellung wurden drei Studien durchgeführt, wobei jeweils die neuroprotektive Wirkung von Einzelsubstanzen sowie das protektive Potential dieser Substanzen in kombinierter Anwendung getestet wurde. Die Experimente waren in einen akuten operativen Abschnitt und einen chronischen postoperativen Abschnitt von sieben Tagen gegliedert.

1.9 Modell der transienten fokalen Ischämie

Das intraluminale Fadenmodell zur Induktion einer fokalen Ischämie wurde erstmals im Jahre 1986 von Koizumi und Mitarbeitern beschrieben.[159] Zwischenzeitlich wurden unter anderem von Zea Longa et al.[338] verschiedene Modifikationen vorgenommen. Mittlerweile hat sich dieses Modell zu einer anerkannten und weitverbreiteten Methodik entwickelt, um pathophysiologische sowie therapeutische Fragestellungen bei permanenter oder transienter fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen.

Das Prinzip dieser Technik beruht in der intraluminalen Blockade des Blutflusses in die A. cerebri media. Dies wird erreicht, indem ein Nylonfaden, nachdem er in die A. carotis interna mikrochirurgisch eingeführt wurde, im Gefäßlumen nach intrakraniell vorgeschoben wird, bis er den Ursprung der A. cerebri media (MCA) verlegt. Die Blutzufuhr der MCA aus der A. carotis interna, A. cerebri anterior und A. cerebri posterior ist damit unterbrochen. Durch das Zurückziehen des Fadens wird die Reperfusion eingeleitet (s. **Abbildung 6**).

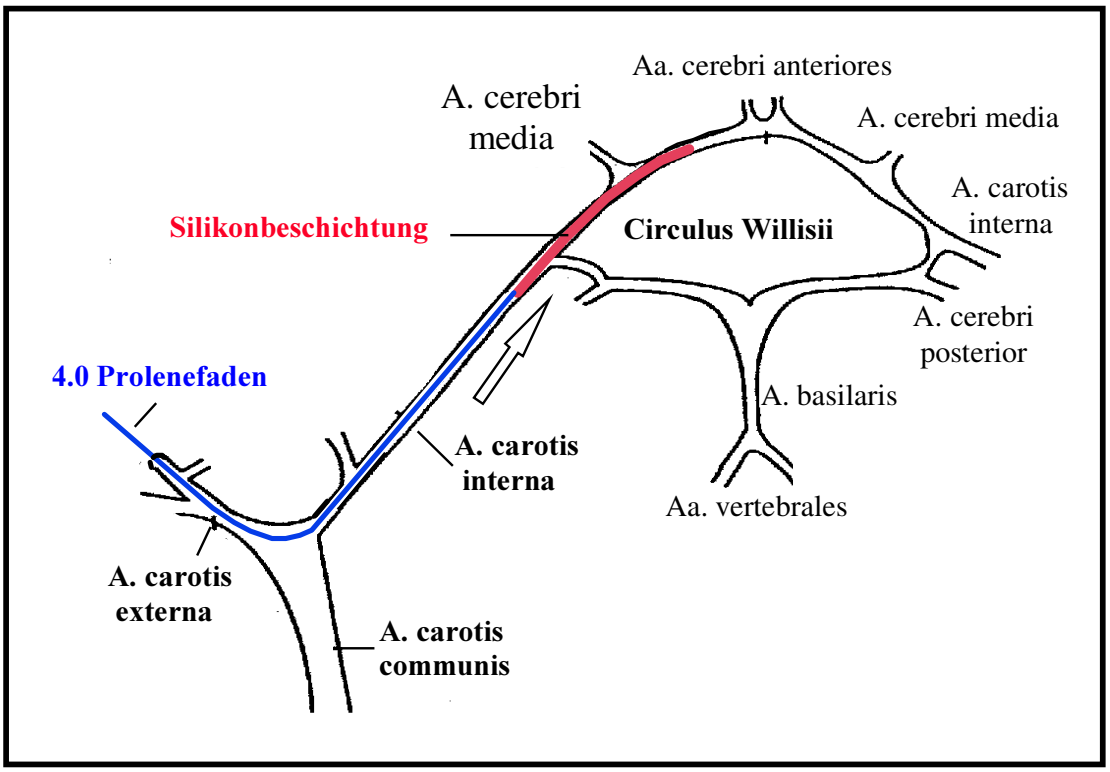

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Circulus Willisii und Okklusion der A. cerebri media.
Ein 4-0 Prolene-Faden wird über die A. carotis externa in die A. carotis interna eingeführt und vorgeschoben bis sein distales, silikonbeschichtetes Ende den Abgang der A. cerebri media verschließt. Die Kollateralzirkulation über die A. communicans anterior und posterior ist somit ebenfalls ausgeschaltet.

1.10 Versuchstiere und Haltung

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 240 und 300 g verwendet. Die Tiere stammten aus den etablierten Züchtungen des Charles River Labors (Sulzfeld, Deutschland). Nach Anlieferung ans Institut für Chirurgische Forschung wurden die Tiere innerhalb von zehn Tagen dem mikrochirurgischen Eingriff unterzogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen bei 22°C Raumtemperatur und 60 % Luftfeuchtigkeit im 12 h Hell-/Dunkelrhythmus. Trockenfutter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung, lediglich 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Trockenfutter vorenthalten. Unmittelbar nach Beendigung der Operation bis zum Versuchsende am siebten Tag war den Tieren in Einzelhaltung wieder freier Zugang zu Futter und Wasser gewährt.

1.11 Versuchsablauf der Akutphase

Während der operativen Akutphase wurde die A. cerebri media für 90 Minuten verschlossen, was eine fokale zerebrale Ischämie im Versorgungsgebiet dieser Arterie induzierte. Entsprechend der klinischen Situation mit häufig vorhersehbarem, temporärem Gefäßverschluss im Rahmen neurochirurgischer Operationen wurde bereits vor Induktion der Ischämie das zu prüfende Therapieschema begonnen. Physiologische Parameter wurden regelmäßig kontrolliert und der kortikale zerebrale Blutfluss in beiden Hemisphären mittels Laser-Doppler Flowmetrie kontinuierlich aufgezeichnet. In der dritten Versuchsreihe wurde zusätzlich die postischämische elektrophysiologische Erholung durch Ableitung des Elektroenzephalogramms (EEG) ermittelt. Bei dieser dritten Studie wurde das prophylaktische Potential milder Hypothermie getestet, indem bereits vor Induktion der Ischämie die Körper- sowie die Hirntemperatur auf 33°C gesenkt wurde.

Die einzelnen Schritte im Versuchsablauf sind in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben. Zum besseren Verständnis ist in **Abbildung 7** das Versuchsprotokoll der Akutphase dargestellt. Auf diese Abbildung wird in den nachfolgenden Abschnitten mehrmals Bezug genommen.

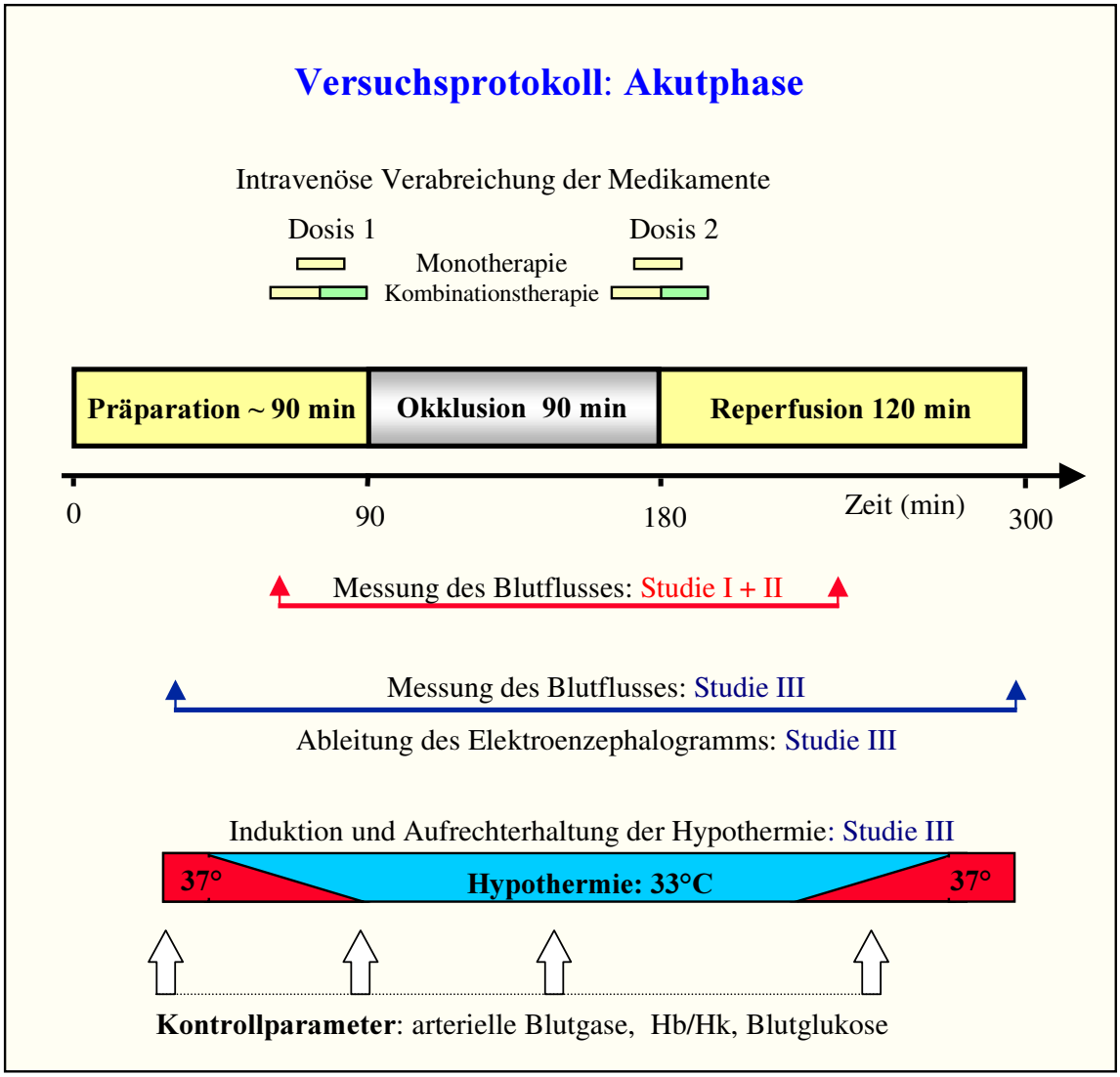

Abbildung 7: Versuchsprotokoll - Akutphase

Die Pharmaka (Tirilazad und Dextromethorphan in Studie I bzw. Tirilazad und Magnesium in Studie II und III) oder das Lösungsmittel (NaCl, Zitronensäure) wurden vor Induktion der Ischämie intravenös als Kurzinfusion verabreicht. Die erste Infusion wurde 30 Minuten vor Induktion der Ischämie, die zweite Infusion 15 Minuten vor Reperfusion gestartet.

Der lokale zerebrale Blutfluss mittels Laser-Doppler Flowmetrie und das EEG wurden vor Induktion der Hypothermie und vor Verabreichung der Pharmaka bis 120 Minuten nach Reperfusion aufgezeichnet (Studie III). In Studie I und II wurde jeweils 30 Minuten vor Ischämie bis eine Stunde nach Reperfusion aufgezeichnet.

Arterielle Blutgase (pH, pO_2, pCO_2), Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk) und der Blutzuckerspiegel wurden vor, während und nach der Ischämie bestimmt. In den Hypothermiegruppen wurde die Körperkerntemperatur und subtemporale Temperatur mittels Kühlelementen auf 33°C herabgesenkt und konstant gehalten. Vor Induktion der Ischämie wurde ein Intervall von 20 Minuten zur physiologischen Stabilisierung gewährt. 30 Minuten nach Reperfusion wurden die Versuchstiere um 1°C pro 10 Minuten wieder auf 37°C erwärmt.

1.11.1 Narkoseeinleitung und Narkoseführung

In allen Experimenten wurde eine Intubationsnarkose mit Halothan (Halothan, Hoechst AG, Deutschland) und einem Lachgas-Sauerstoff-Gemisch durchgeführt. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine kontrollierte mechanische Ventilation der oftmals verwendeten Spontanatmung während Tierexperimenten deutlich überlegen ist und kontrollierte Versuchsbedingungen gewährleistet.[336] Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 4 Vol% Halothan in einem luftdicht geschlossenen Plexiglaskäfig. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden 0,5 mg/kg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg, Braun AG, Deutschland) subkutan appliziert. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf einer schrägen Ebene gelagert und unter dem Operationsmikroskop (OPMI 6-SH, Zeiss AG, Deutschland) orotracheal intubiert. Als Tubus diente eine Venenverweilkanüle (Vasculon® Plus, 16 G, BOC Ohmeda AB, Dänemark). Die Kanüle wurde zuvor in 2,5 cm Entfernung von der Spitze außen mit einem Silikonkonus (∅: 5 mm) (Rhodorsil RTV 1556 A und B Pink, Rhone Poulene, Frankreich) ummantelt. Dieser Silikonkonus gewährleistete einen suffizienten Verschluss der Glottis und verbesserte die Qualität der Beatmung. Der Tubus wurde mit Pflaster am Unterkiefer fixiert und nach Umlagern der Ratte auf den Operationstisch an den Respirator (Pressure Controlled Respirator, RSP 1002, Kent Scientific Corporation, USA) angeschlossen.

Die Narkoseführung erfolgte mit 0,8 - 1,0 Vol% Halothan in einem Lachgas-Sauerstoff-Gemisch von 70 % N_2O und 30 % O_2. Die druckgesteuerte mechanische Ventilation wurde bei einer Frequenz von 100 - 110 Hübe pro Minute und einem maximalen inspiratorischen Druck von 10-13 cm H_20 durchgeführt. Durch regelmäßige Blutgasanalyse wurden die Blutgasparameter kontrolliert und die Beatmung entsprechend reguliert.

1.11.2 Kontrolle der physiologischen Parameter

1.11.2.1 Blutdruck

Während der akuten Versuchsphase wurde eine kontinuierliche Blutdruckaufzeichnung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Polyethylenkatheter (Innendurchmesser: 0,58 mm, Portex Co, England) in die Schwanzarterie eingeführt und an einen Druckwandler angeschlossen. Mit dem Blutdruckmessgerät (Sirecust 304 D, Siemens,

Deutschland), welches regelmäßig einer Zweipunkt-Eichung unterzogen wurde, konnte somit der mittlere arterielle Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet werden. Der Katheter wurde während des gesamten Versuchs mit physiologischer Kochsalzlösung (0,2 ml/h) gespült.

1.11.2.2 Arterielle Blutgase

Die Regulation der Blutgasparameter wurde durch regelmäßige Kontrollen mit Hilfe eines Blutgas-Analysegerätes (280 Blood Gas System, Ciba Corning, USA) gewährleistet. Dazu wurde mit einer Kapillare arterielles Blut über den in der Schwanzarterie liegenden Polyethylenkatheter entnommen.

1.11.2.3 Hämoglobin und Hämatokrit

Bei der intravenösen Verabreichung der Wirkstoffe wurde auf identische Infusionsvolumina geachtet, um Auswirkungen auf die Ergebnisse durch unterschiedliche Hämodilution zu vermeiden. Um auch die Effekte größerer Blutverluste beurteilen zu können, wurde der Hb-Wert sowie der Hämatokrit simultan zur Blutgaskontrolle zu mehreren Zeitpunkten während des Versuchs mit beschriebenem Analysegerät ermittelt.

1.11.2.4 Blutzucker

Mit dem Ziel, normoglykämische Versuchsbedingungen bei geringer Varianz zu schaffen, wurden die Tiere 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten. Zur Kontrolle wurden intraoperativ jeweils vor sowie nach Ischämie mit einem Blutzuckermessgerät (Glucometer Elite® 3905, Bayer Diagnostics, Deutschland) die Blutglukosewerte bestimmt. Dadurch sollten auch eventuelle Beeinflussungen des Blutzuckerspiegels durch die Wirkstoffe erfasst werden.

1.11.2.5 Temperatur

Zwei getrennte Regelkreise gewährleisteten eine möglichst genaue Regulation der Körper- sowie der Hirntemperatur. Die Ratten waren während des Versuchs auf einer Wärmeplatte gelagert. Eine rektale Temperatursonde wurde mit einem Modul verbunden, welches die Temperatur der Heizplatte entsprechend dem Sollwert regelte. Ein in eine Kanüle eingelötetes Mantel-Thermoelement (AB Ac 025/TI/335/D 40/2 AB K/2 m, THERMOCOAX, Philips Industrial Electronics GmbH, Deutschland) wurde im M.

temporalis platziert und ebenfalls mit einem Regelmodul (Industrial Controller Version 407, Philips Prozess- und Maschinen-Automation GmbH, Deutschland) verbunden. Dieses Regelmodul steuerte eine Heizlampe, die auf den Kopf der Ratten gerichtet war. Dies ermöglichte, ohne Eröffnung der Kalotte oder Verletzung des Gehirns, die intrazerebrale Temperatur zu regeln. Sowohl die Körperkerntemperatur als auch die Hirntemperatur konnten mit dieser Anordnung separat und vor allem sehr exakt reguliert werden.

In Studie III der vorliegenden Arbeit war die Fragestellung, ob durch eine pharmakologische Kombinationstherapie die Wirksamkeit von milder Hypothermie weiter gesteigert werden kann. Die Hypothermieanwendung wurde entsprechend dem klinischen Vorbild vor Beginn der ischämischen Periode eingeleitet (s. **Abbildung 7**).

Etwa 60 Minuten vor dem Gefäßverschluss wurde begonnen mit Kältebeutel die Körper- und Hirntemperatur um 1°C pro 10 Minuten zu senken, indem regelmäßig die Sollwerte der beiden Temperaturregelkreise entsprechend reduziert wurden. Sobald die angestrebte Temperatur von 33°C erreicht war, wurde nach einer kurzen Stabilisierungsphase die Arterie verschlossen. Somit waren bereits vor Ischämiebeginn hypotherme Versuchsbedingungen gegeben, die bis 30 Minuten nach Einleitung der Reperfusionsphase aufrechterhalten wurden. Im Anschluss wurde die Temperatur wieder um 1°C pro 10 Minuten in den normothermen Bereich angehoben.

1.11.3 Messung des kortikalen Blutflusses

Im Versuchsaufbau wurde die Technik der Laser-Doppler Flowmetrie zur Messung des kortikalen Blutflusses (LCBF) angewandt. Es wurden nach medialer Inzision der Kopfhaut zwei Trepanationslöcher mit einem Durchmesser von 1-2 mm, jeweils 5 mm lateral und 1 mm posterior des Bregmas, über dem dorsolateralen Kortex gebohrt. Dabei war zu beachten, dass die Dura unverletzt blieb. Anschließend wurde der Kopf des Tieres auf dem Rücken liegend in einem stereotaktischen Halter (Model 900, David Kopf Instruments, USA) fixiert. Es wurden sogenannte "non-rupture ear bars" verwendet (s. **Abbildung 8**). Zwei spezialangefertigte, abgewinkelte Laser-Doppler Sonden (Spezialanfertigung, Medizin-Elektronik Lawrenz, Deutschland) wurden mit Hilfe von Mikromanipulatoren von unten in die Bohrlöcher vorsichtig eingeführt und der Dura leicht aufgesetzt. Dieses Manöver wurde unter Sicht mittels eines Spiegels durchgeführt. Um artifizielle Lichtspiegelungen zu

vermeiden, wurde der Kopfbereich der Ratten und die Sonden mit dunkelblauem Stoff abgedeckt. Das Messgerät (MBF3D, Moor Instruments Ltd., England) zeichnete bei einer Frequenz von 2 Hz den lokalen kortikalen Blutfluss kontinuierlich auf. Die Aufzeichnung erfolgte vom Zeitpunkt der Platzierung der Sonden bis eine Stunde (Studie I + II) bzw. zwei Stunden (Studie III) nach Beginn der Reperfusion (s. **Abbildung 7**). In **Abbildung 9** ist eine Bildschirmkopie einer exemplarischen Laser-Doppler Kurve dargestellt.

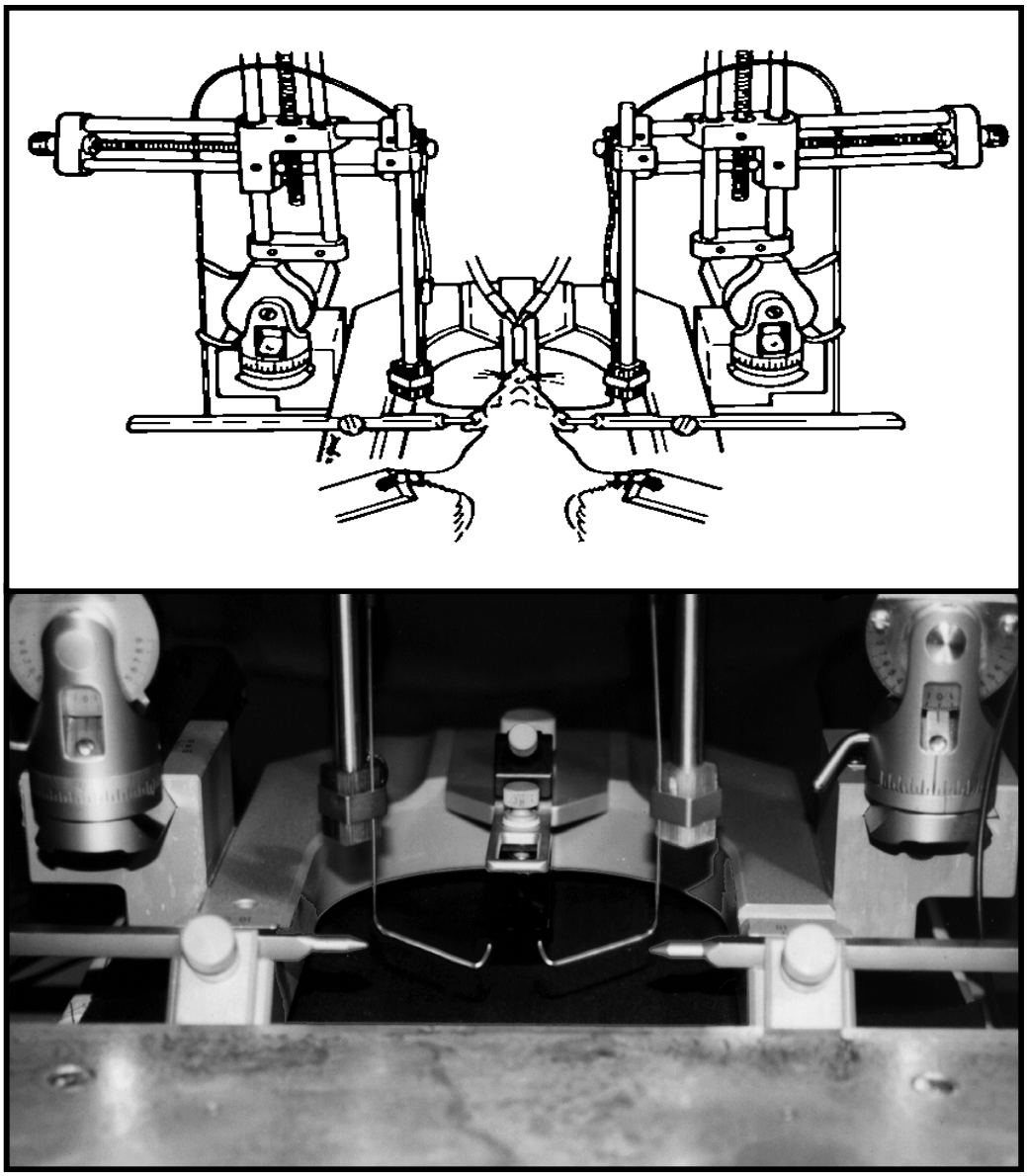

Abbildung 8: Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden in Rückenlage im stereotaktischen Halter fixiert. Zwei abgewinkelte Laser-Doppler Sonden wurden mit Hilfe von Mikromanipulatoren platziert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine kontinuierliche Messung der lokalen mikrovaskulären Perfusion in beiden Hemisphären ohne Reposition der Sonden während des Experiments.

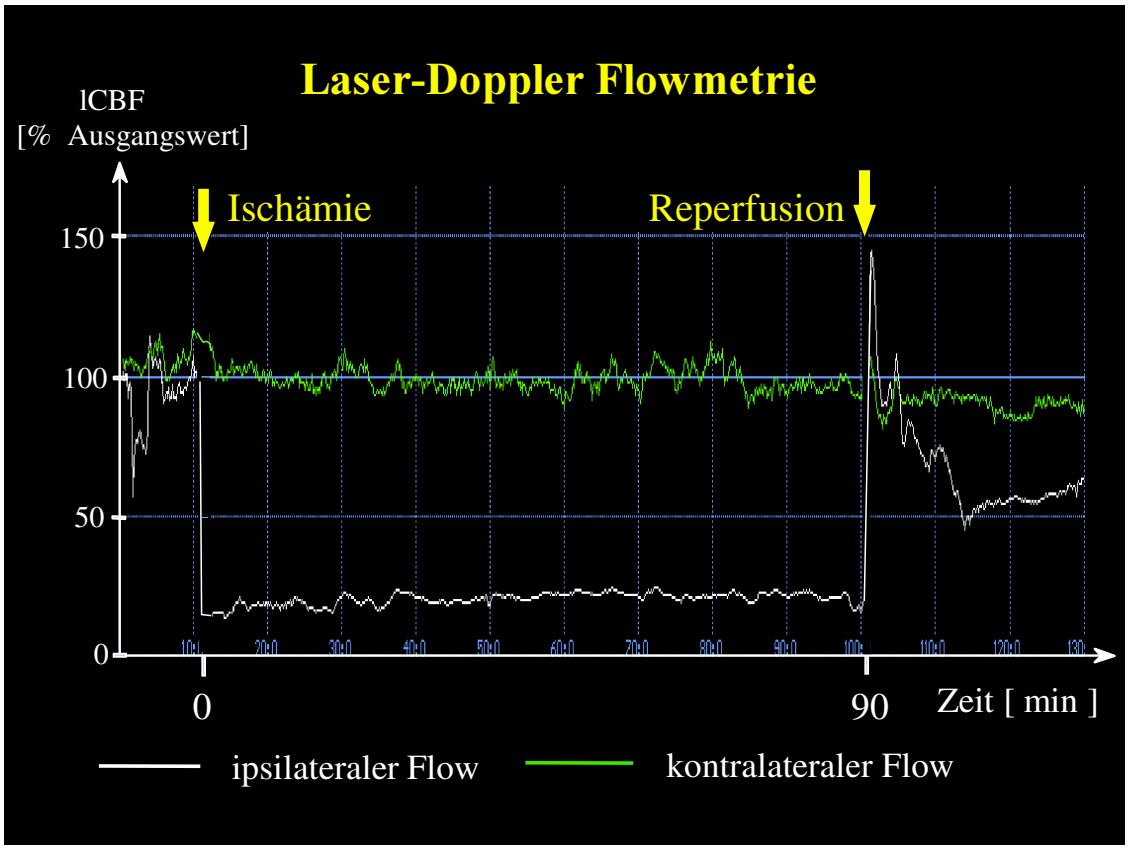

Abbildung 9: Bildschirmkopie einer exemplarischen Laser-Doppler Kurve

Die weiße Kurve zeigt den Verlauf der Perfusion im Versorgungsgebiet der ipsilateralen A. cerebri media, die grüne Kurve im Versorgungsgebiet der kontralateralen A. cerebri media (relativ im Vergleich zum Ausgangswert von 100%). Der kurze Abfall der Perfusion im ipsilateralen Flux ist bedingt durch die temporäre Okklusion der A. carotis communis beim Einführen des Fadens.

Im Verlauf der Laser-Doppler Kurve erkennt man den prompten Abfall der Perfusion bei Okklusion der MCA, gefolgt von 90 Minuten Ischämie. Nach Reperfusion tritt eine kurze Phase der postischämischen Hyperämie mit folgender verzögerter Hypoperfusion auf.

Ableitung des Elektroenzephalogramms (EEG)

In Studie III wurde zusätzlich zu den bisher beschriebenen Parametern die elektrophysiologische Erholung objektiviert. Dazu wurden zwei Silberelektroden mit der metallischen Ummantelung der Laser-Doppler Sonden unter Verwendung eines speziell gefertigten silbernen Konnektors verbunden (s. **Abbildung 10**). Da diese Sonden der Dura mater leicht aufgesetzt waren, konnte somit über beiden Hemisphären das EEG unipolar gegenüber einer Referenzelektrode abgeleitet werden, ohne für diesen Zweck weitere Bohrungen in die Kalotte vornehmen zu müssen. Durch das Auffüllen der Bohrlöcher mit Elektrodengel wurde der Kontakt zwischen Sonden und Dura verbessert. Die Referenzelektrode wurde am Unterkiefer befestigt, während eine Erdungselektrode am Schwanz der Ratte platziert wurde. Die Aufzeichnung mit dem EEG-Gerät (EEG-7109, Nihon Kohden Kogyo Ltd., Japan) erfolgte bei einer Bandbreite von 0,15 - 45 Hz und einer Amplitude von 1,2 mm/50 µV. Ein exemplarischer EEG-Verlauf während eines Experiments ist in **Abbildung 11** dargestellt.

1.11.4 Verabreichung der Medikamente

Die Medikamente wurden in den Lösungsmitteln (0.9% NaCl oder 0,02 M Zitronensäure) gelöst und mittels eines Perfusors (sp100i syringe pump, WPI) durch einen in der Femoralvene platzierten Polyethylenkatheter (Innendurchmesser: 0,28 mm, Portex Co, England) intravenös über 15 Minuten infundiert. Die Medikamente wurden in den entsprechenden Dosierungen jeweils zu zwei Zeitpunkten verabreicht: 15 Minuten vor Ischämie und bei Reperfusion. Bei kombinierter Anwendung wurden die Wirkstoffe aufeinanderfolgend appliziert (s. **Abbildung 7**).

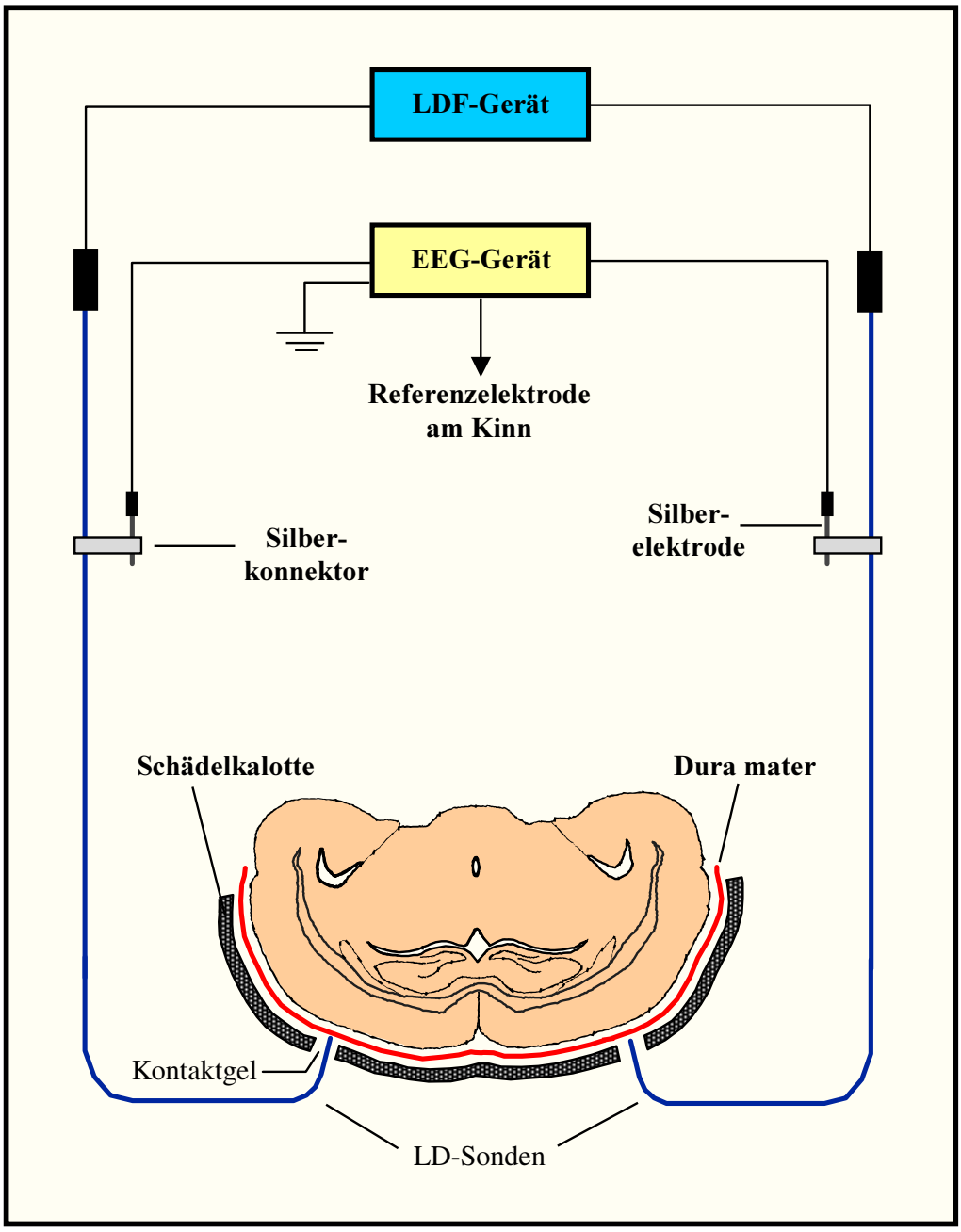

Abbildung 10: Prinzip der simultanen EEG- und LDF-Ableitung.

Die Laser-Doppler Sonden, die an der Halterung des Mikromanipulators elektrisch isoliert angebracht waren, wurden vorsichtig in die Bohrlöcher eingeführt, so dass sie der Dura mater sanft anlagen. Durch Silberkonnektoren wurden die EEG-Elektroden mit den Stahlhüllen der LD-Sonden verbunden. Um optimale Leitfähigkeit zu gewährleisten, wurden die Bohrlöcher zusätzlich mit Elektrodengel gefüllt. Eine Referenzelektrode zur EEG-Ableitung wurde am Unterkiefer der Ratte angebracht. Eine Erdungselektrode wurde am Schwanz subkutan platziert.

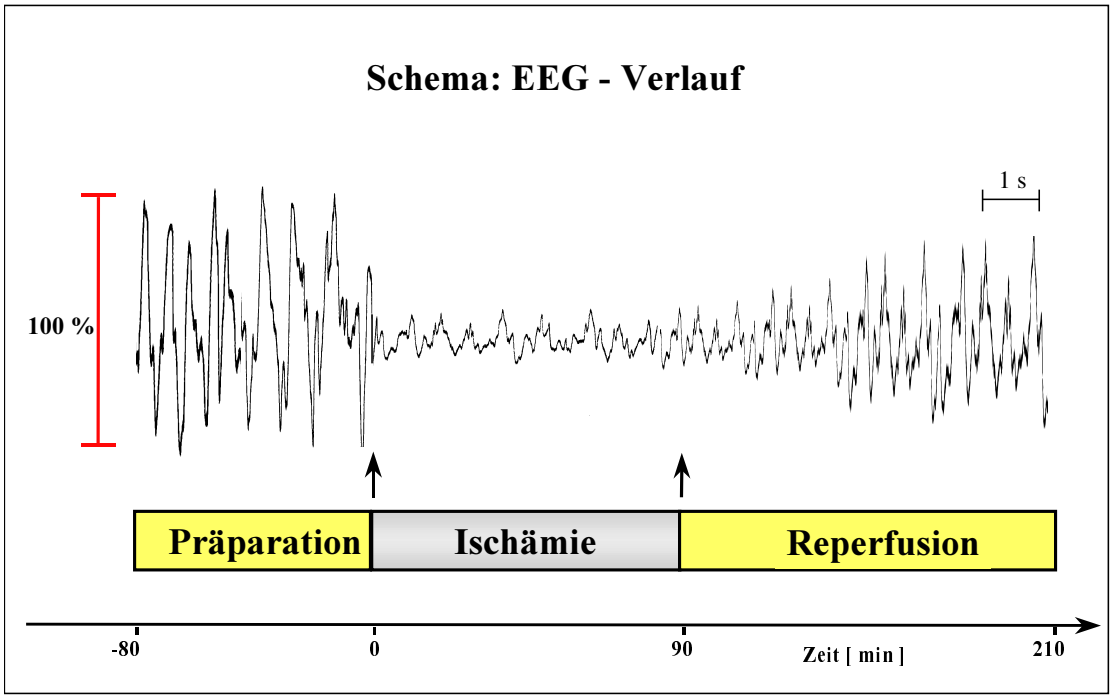

Abbildung 11: Exemplarischer EEG-Verlauf während eines Experiments

Vor der Gefäßokklusion leitet sich ein normales EEG-Muster mit konstanter Amplitude ab. Innerhalb von 5 bis 10 Sekunden nach dem Gefäßverschluss tritt eine prompte Abnahme der EEG-Amplitude auf. In Relation zur präischämischen Amplitude beträgt diese ca. 25-30 %. Während der gesamten Ischämiedauer bleibt die EEG-Amplitude konstant niedrig und nimmt erst nach Beginn der Reperfusion stetig wieder zu. Die Ausgangsamplitude wird jedoch nicht wieder erreicht.

1.11.5 Induktion der reversiblen fokalen Ischämie

Die Präparation der Halsgefäße wurde wie von Koizumi et al. beschrieben vorgenommen.[159] Zunächst wurde rechts paramedian ein ca. drei Zentimeter langer Hautschnitt am Hals durchgeführt. Die rechte Speicheldrüse wurde durch schonende Präparation zusammen mit dem rechten M. sternocleidomastoideus mit Hilfe eines Häkchens nach lateral mobilisiert und fixiert. Die prätracheale Muskulatur wurde mit einem zweiten Häkchen nach medial verlagert. Damit war die Carotisbifurkation sichtbar, jedoch noch von Bindegewebe und Nervengeflecht umgeben. Die Bifurkation wurde unter Schonung des N. vagus von

umgebendem Gewebe mikrochirurgisch freipräpariert. Die A. carotis externa wurde isoliert und ca. fünf Millimeter distal der Bifurkation ligiert und durchtrennt. Anschließend wurde die A. carotis communis ca. sechs Millimeter proximal und die A. carotis interna ca. vier Millimeter distal der Bifurkation mit einem temporären Gefäßclip verschlossen.

Die Blutversorgung des Gehirns über die A. carotis interna war somit unterbrochen. Da bei der Ratte der Blutfluss über die Kollateralen des Circulus Willisii für die Hirndurchblutung ausreichend ist, resultierte daraus keine Mangelversorgung. Durch diesen temporären Verschluss war die Eröffnung des ligierten Externastumpfs möglich, um einen drei Zentimeter langen 4.0-Prolenefaden (Ethicon GmbH, Deutschland) bis in das Lumen der A. carotis interna einzuführen. Eine Ligatur um die A. carotis externa inklusive Faden dichtete das Gefäßsystem wieder ab. Die distalen vier Millimeter des Fadens waren mit einem Silikonzylinder (Rhodorsil RTV 1556 A und B Pink, Rhone Poulene, Frankreich) beschichtet. Nach Entfernung der Gefäßclips von den Arterien wurde der Faden vorsichtig im Lumen der A. carotis interna nach intrakraniell vorgeschoben, bis die silikonbeschichtete Spitze am Abgang der A. cerebri media zum Liegen kam. Die Blutzufuhr der A. cerebri media und der Aa. lenticulostriatae, welche u.a. die Capsula interna versorgen, war damit unterbrochen. Der Verschluss war für den Operateur unmittelbar am Abfall des ipsilateralen Laser-Doppler Signals auf ca. 20% des Ausgangswertes erkennbar. Für die Zeitdauer der 90-minütigen Ischämie wurde mit einem Gefäßclip auf den Externastumpf der Faden fixiert, um einer unerwünschten Dislokation und der damit verbundenen Reperfusion vorzubeugen. Die Reperfusion des Areals wurde durch das Zurückziehen des Fadens in den Stumpf der A. carotis externa erreicht. Die A. carotis externa wurde proximal ligiert und der Faden entfernt.

1.11.6 Operationsende

Am Ende der Operation wurden alle Katheter und Sonden entfernt. Nach sorgfältiger Blutstillung wurden die Wunden mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Beatmung wurde auf Raumluft umgestellt, um die Tiere aus der Narkose erwachen zu lassen. Sobald die Spontanatmung ausreichend war, wurden die Ratten extubiert. Während der nächsten Stunde waren die Tiere unter ständiger Beobachtung, bis sie sich in wachem und stabilem Zustand befanden. Dann wurden sie in den Tierstall des Instituts gebracht, wo in Einzelhaltung freier Zugang zu Wasser und Trockenfutter gewährt wurde.

1.12 Versuchsablauf der Chronischen Phase

Während des postoperativen Beobachtungszeitraums von sieben Tagen wurden die Gewichtsentwicklung und die funktionellen Defizite im Verlauf quantifiziert. Anschließend wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und mit einer Überdosis KCl getötet. Die Gehirne wurden perfusionsfixiert und histologisch aufgearbeitet. Eine Übersicht gibt das in **Abbildung 12** dargestellte Versuchsprotokoll der chronischen Phase.

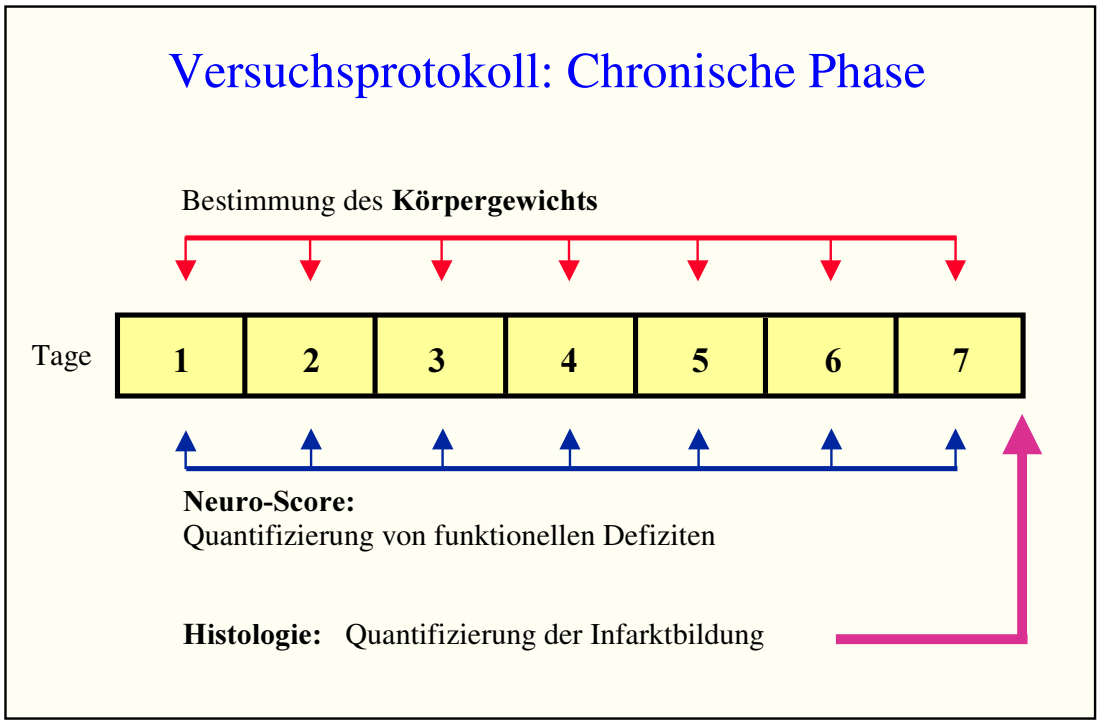

Abbildung 12: Versuchsprotokoll - Chronische Versuchsphase

Die Tiere wurden postoperativ für sieben Tage beobachtet. Dabei wurde täglich das Körpergewicht sowie der Neuro-Score bestimmt. Am siebten Tag wurden die Tiere schließlich geopfert und die Gehirne perfusionsfixiert. Anschließend wurden die Gehirne der histologischen Aufarbeitung zugeführt.

1.12.1 Protokollierung der Gewichtsentwicklung

Die Gewichtsentwicklung gilt als Hinweis auf den Allgemeinzustand der Tiere in den Tagen nach der Operation. Aus diesem Grunde wurde täglich das Körpergewicht der Ratten mittels einer elektronischen Waage ermittelt. Da die Tiere einen ausgeprägten Tag/Nachtrhythmus besitzen, dem auch die Nahrungsaufnahme unterliegt, kann das Körpergewicht über den Tag sehr schwanken. Konsequenterweise wurde deshalb das Gewicht jeweils zur gleichen Tageszeit, am Spätnachmittag, bestimmt.

1.12.2 Bestimmung funktioneller Defizite

Die entstandenen funktionellen Defizite wurden während der postoperativen Versuchsphase durch einen Untersucher, der keine Kenntnis der Therapie hatte, täglich erhoben. Es wurde ein Neuro-Score, der von Bederson und Mitarbeitern beschrieben wurde, in modifizierter Form verwendet.[23;337]
Der Score ist in 6 Grade unterteilt, die in **Abbildung 13** dargestellt sind.

- **Grad 0** stellt die schlechteste Bewertungsstufe dar (keine Spontanbewegungen).
- **Grad 1** wurde vergeben, wenn ein Tier aufgrund einer Hemiparese ohne äußere Einwirkung im Kreis lief (spontanes Circling).
- **Grad 2** entspricht Circling gegen Widerstand durch Ziehen am Schwanz. Hierbei wird die Hemiparese erst bei erhöhtem Kraftaufwand manifest.
- **Grad 3** wurde vergeben, wenn ein Tier keine Tendenz zum Circling mehr aufwies, jedoch eine verminderte Standstabilität bei seitlichem Druck zeigte.
- **Grad 4** entspricht dem Vorhandensein eines eingeschränkten Stellreflexes, d.h. wenn die am Schwanz hochgehaltene Ratte als Zeichen einer latenten Hemiparese die kontralaterale Vorderpfote nicht streckte.
- **Grad 5** erhielt ein neurologisch unauffälliges Tier mit normalem Stellreflex.

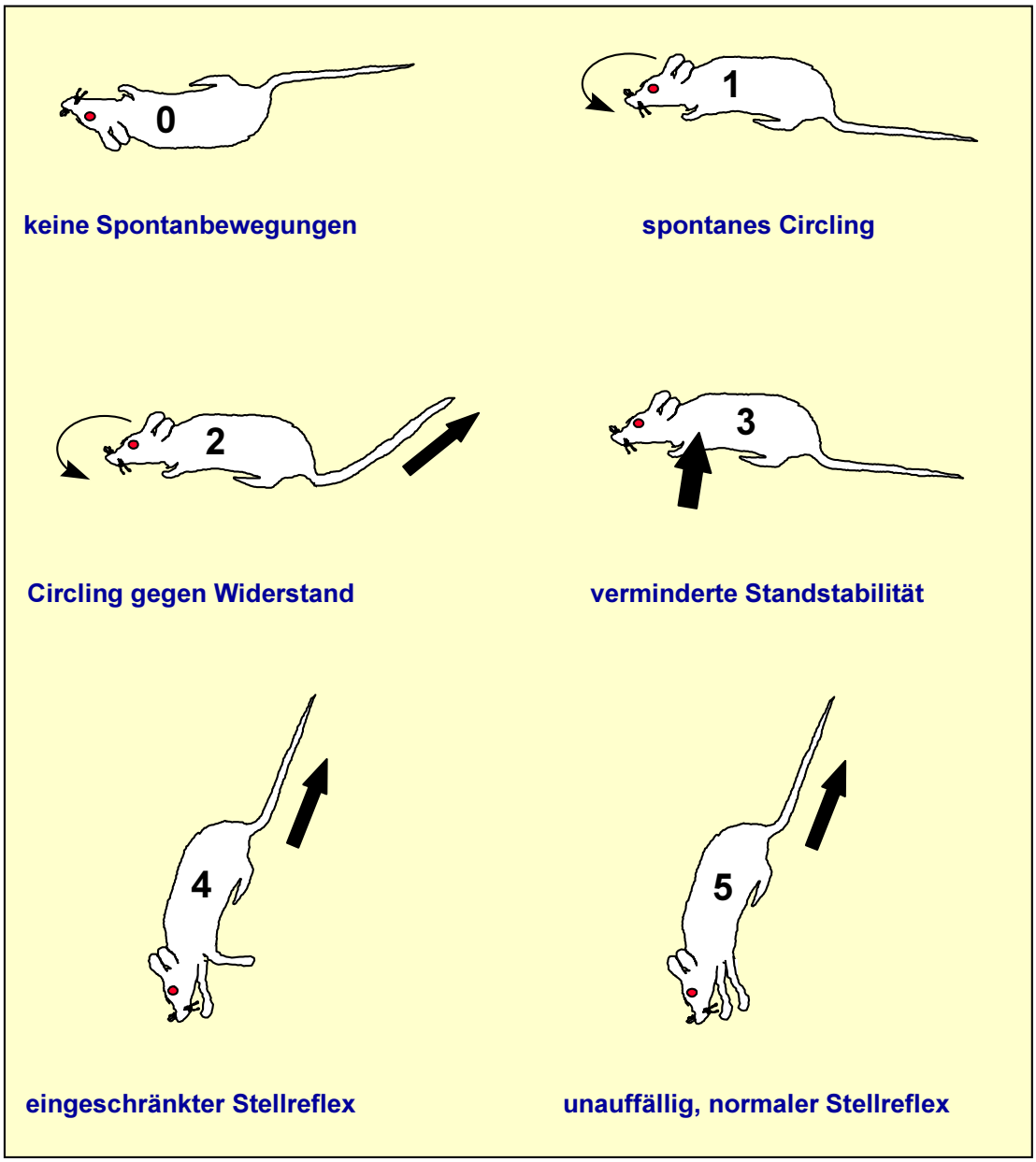

Abbildung 13: Neuro-Score

0 = keine Spontanbewegungen **1** = spontanes Circling

2 = Circling gegen Widerstand **3** = verminderte Standstabilität

4 = eingeschränkter Stellreflex **5** = unauffällig, normaler Stellreflex

1.12.3 Quantifizierung des histomorphologischen Schadens

Zur quantitativen Erfassung des morphologischen Schadens wurden die Gehirne der Versuchstiere am siebten postoperativen Tag perfusionsfixiert, entnommen und für die morphometrische Auswertung histologisch aufgearbeitet. Dazu wurden die Tiere in tiefer Chloralhydratnarkose thorakotomiert, die linke Herzkammer punktiert und das rechte Herzohr eröffnet. Über die Punktionsnadel im linken Ventrikel erfolgte bei einem hydrostatischen Druck von ca. 150 cm H_2O zunächst eine Spülung des gesamten Gefäßsystems mit physiologischer Kochsalzlösung. Nachdem aus dem rechten Herzohr klare Flüssigkeit austrat, wurde die Spülung mit 150 ml einer Phosphat-gepufferten (pH=7,4) Paraformaldehydlösung (2%, Merck, Darmstadt) fortgeführt.[45] Die Schädelkalotte wurde eröffnet, die harte Hirnhaut entfernt und schließlich das Gehirn vorsichtig entnommen. Nachdem die Gehirne mindestens 24 Stunden in Paraformaldehydlösung aufbewahrt waren, wurden sie mit Alkohol in steigender Konzentration entwässert. Anschließend wurden durch Methylsalicylat (Merck, Darmstadt) die Alkoholreste entfernt und die Gehirne in Rotihistol (Roth, Karlsruhe) als Intermedium zur Einbettung aufbereitet. Abschließend wurde die Einbettung in Paraffin vorgenommen. Mit einem Rotationsmikrotom (Reichert-Jung 2030, Deutschland) wurden 24 koronare vier µm dicke Hirnschnitte im Abstand von 400 µm angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Merck, Darmstadt).

Die quantitative Auswertung wurde mittels digitaler Planimetrie durchgeführt. Die Auswertung wurde von Untersuchern vorgenommen, die keine Kenntnis der Therapie hatten. Jeder Gehirnschnitt wurde mit einer Digitalkamera und entsprechender Software (OPTIMAS 5.1, BioScan Incorporated, Edmonds, U.S.A.) digitalisiert. Gleichzeitig wurde jeder Schnitt mikroskopisch untersucht und nach histopathologischen Kriterien beurteilt. Dadurch konnte an der digitalen Aufzeichnung das Infarktareal markiert und vermessen werden. In den Infarkt eingeschlossen wurden per definitionem lediglich pannekrotische Areale, die sich vor allem durch Vakuolisierungen und pyknotische Zellkerne demarkierten. Das gesamte Infarkt-volumen (I_{ges}) wurde berechnet, indem die infarzierte Fläche aller Schnitte summiert ($I_1+I_2+I_3+...I_{24}$) und anschließend mit dem Abstand (400 µm) zwischen den Schnitten multipliziert wurde. Die Formel zur Berechnung des gesamten Infarktvolumens lautete folgendermaßen:

$$Iges = (I_1+I_2+I_3+...I_{24}) \times 0{,}4\ mm^3$$

Zusätzlich wurden die Teilvolumina der Infarkte im Kortex sowie in den Stammganglien berechnet. Dabei wurde die Fläche der Teilinfarkte in fünf definierten Schnitten im Abstand von 2,0 / 3,6 / 5,2 / 6,8 und 8,4 Millimeter vom Frontalpol des Gehirns bestimmt. Die Lokalisation der Stammganglien und des Kortex wurde einem stereotaktischen Atlas des Rattenhirns entnommen.[238] Die Berechnung der Teilvolumina (I_{Teil}) erfolgte nach dem selben Prinzip wie oben beschrieben. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug bei dieser Bestimmung 1,6 Millimeter:

$$I_{Teil} = (I_1+I_2+I_3+I_4+I_5) \times 1{,}6\ mm^3$$

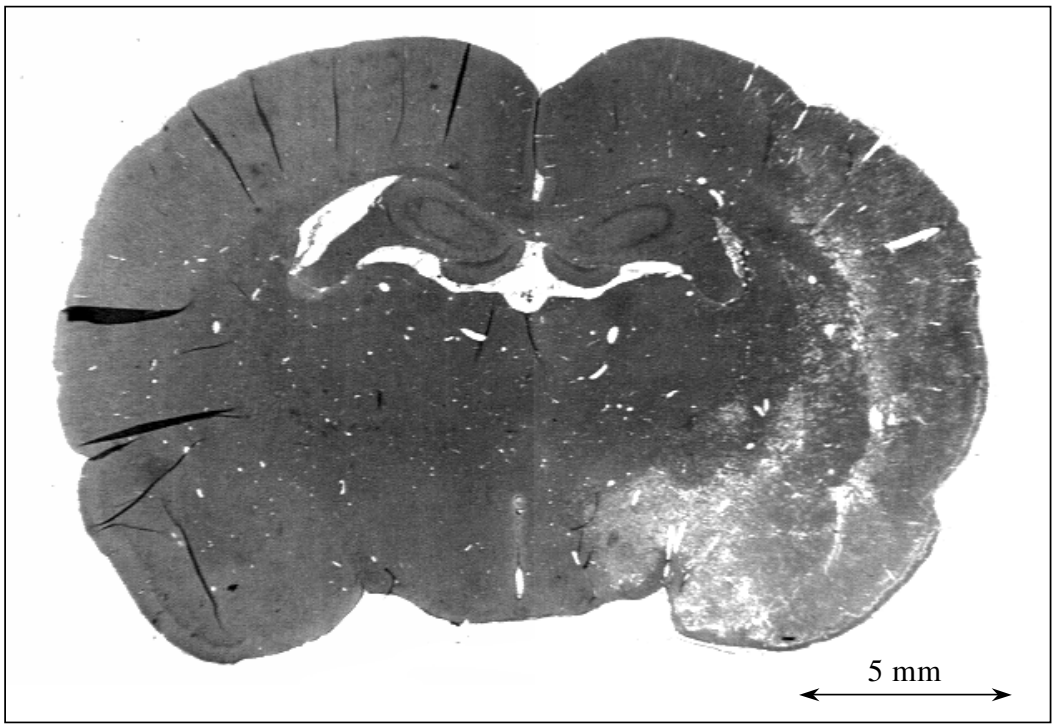

Abbildung 14: Koronarer Hirnschnitt

Das Rattenhirn wurde koronar geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Mit Hilfe einer Schwarz-Weiß-Digitalkamera wurden die Schnitte anschließend digitalisiert und das Infarktvolumen vermessen. Die Abbildung zeigt einen digitalisierten Hirnschnitt mit großen Aufhellungen im Bereich der im Bild rechts befindlichen Hemisphäre. Diese entsprechen einem ausgeprägten Hirninfarkt, mit typischer Lokalisation nach Verschluss der A. cerebri media. Es waren sowohl kortikale Anteile als auch subkortikale Strukturen im Bereich der Stammganglien betroffen.

1.13 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Sigma Stat® (Version 2.0 für Windows, Jandel Scientific Software, USA) an einem IBM-kompatiblen Computer durchgeführt.

Sofern die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt war, wurden die physiologischen Parameter, die Daten der Laser-Doppler Flowmetrie sowie die Infarktvolumina mit der Varianzanalyse auf statistische Signifikanz getestet. Als post hoc Test wurde der Dunnett´s-Test verwendet. Die nicht parametrischen Daten des neurologischen Scores wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und nachfolgend mit dem nicht parametrischen Dunnett´s-Test verglichen.

Die Werte sind meist als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit sind in einigen Diagrammen die Werte als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) aufgetragen. Das geforderte Signifikanzniveau (*) betrug $p<0,05$.

1.14 Experimentelle Gruppen

Da im Rahmen dieser Arbeit insgesamt drei Einzelstudien durchgeführt wurden, werden in den folgenden drei Kapiteln Einzelheiten zu den experimentellen Gruppen erläutert. Zu den von uns verwendeten Wirkstoffen lagen zum Zeitpunkt der Versuchsplanung bereits eine große Anzahl von tierexperimentellen Untersuchungen vor, so dass wir uns bei der Auswahl der Dosierungen an Literaturangaben orientieren konnten.

1.14.1 Studie I: Dextromethorphan und Tirilazad

In Studie I sollte getestet werden, ob der kombinierte Einsatz von Tirilazad mesylate (Freedox® Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA) und Dextromethorphan (Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) in einer Verbesserung der Neuroprotektion im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien resultiert. Es wurden 44 Sprague-Dawley Ratten verwendet. Vier Ratten erlitten eine SAB und wurden ausgeschlossen. Die verbleibenden Versuchstiere wurden einer von fünf Gruppen randomisiert zugeteilt:

1.	Tirilazad	Dosierung: 2 x 3 mg/kg	(n = 10)
2.	Dextromethorphan	Dosierung: 2 x 20 mg/kg	(n = 10)
3.	Tirilazad + Dextromethorphan	Dosierung: 2 x 3 mg/kg Dosierung: 2 x 20 mg/kg	(n = 10)
4.	Vehikel A:	0,9 % Kochsalzlösung	(n = 5)
5.	Vehikel B:	0,02 M Zitronensäure	(n = 5)

Da die Lösungsmittel der beiden Wirkstoffe unterschiedlich waren - Tirilazad in 0,02 M Zitronensäure, Dextromethorphan in 0,9% NaCl-Lösung - wurden in den Kontrollgruppen jeweils fünf Tiere mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt. Die Dosierungen entsprechen den durchschnittlichen Angaben in der Literatur für Dextromethorphan[18;32;245;303;305;318] und Tirilazad.[140;178;193;308;344]

1.14.2 Studie II: Magnesium und Tirilazad

In Studie II sollte das neuroprotektive Potential einer Kombination aus Tirilazad und Magnesium überprüft werden. Als Magnesiumsalz wurde Magnesiumchlorid verwendet ($MgCl_2$) (Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland). Es wurden 46 Sprague-Dawley Ratten verwendet. Vier Ratten erlitten eine SAB, zwei Ratten hatten eine insuffiziente Okklusion der A. cerebri media und wurden ausgeschlossen. Die verbleibenden Versuchstiere wurden folgenden Gruppen randomisiert zugeteilt:

1.	Tirilazad	Dosierung:	2 x 3	mg/kg	(n = 10)
2.	$MgCl_2$	Dosierung:	2 x 1	mmol/kg	(n = 10)
3:	Tirilazad	Dosierung:	2 x 3	mg/kg	
	+ $MgCl_2$	Dosierung:	2 x 1	mmol/kg	(n = 10)
4.	Vehikel A:	0,9 % Kochsalzlösung			(n = 5)
5.	Vehikel B:	0,02 M Zitronensäure			(n = 5)

Die Dosierungen entsprechen den durchschnittlichen Angaben in der Literatur für $MgCl_2$[30;56;134;325] und Tirilazad.[140;178;193;308;344]

1.14.3 Studie III: Magnesium, Tirilazad und Hypothermie

In Studie III wurde überprüft, ob durch die zusätzliche Anwendung milder Hypothermie (33°C) die neuroprotektive Wirksamkeit der kombinierten Pharmakotherapie mit Tirilazad und Magnesium gesteigert werden kann. Die Dosierungen entsprechen den durchschnittlichen Angaben in der Literatur für $MgCl_2$[30;40;56;56;134;294;325] und Tirilazad.[178;193;308]

In den Hypothermiegruppen wurde die Körpertemperatur und subtemporale Temperatur mittels Kühlelemente auf 33°C herabgesenkt. Vor Induktion der Ischämie wurde ein Intervall von 20 Minuten zur physiologischen Stabilisierung gewährt. Nach 30 Minuten Reperfusion wurden die Körpertemperatur mit Hilfe einer Wärmeplatte und die subtemporale Temperatur mit Hilfe einer Wärmelampe über zwei unabhängige Regelkreise um 1°C pro 10 Minuten angehoben, bis 37°C erreicht waren.[140;344]

Es wurden 42 Sprague-Dawley Ratten verwendet. Zwei Ratten erlitten eine SAB und wurden ausgeschlossen. Folgenden Gruppen wurden die verbleibenden 40 Tiere randomisiert zugeteilt:

1.	Hypothermie A	Temperatur: 33°C 0,9 % Kochsalzlösung	(n = 5)
2.	Hypothermie B	Temperatur: 33°C 0,02 M Zitronensäure	(n = 5)
3.	Tirilazad + $MgCl_2$	Dosierung: 2 x 3 mg/kg Dosierung: 2 x 1mmol/kg	(n = 10)
4.	Hypothermie + Tirilazad + $MgCl_2$	Temperatur: 33°C Dosierung: 2 x 3 mg/kg Dosierung: 2 x 1mmol/kg	(n = 10)
5.	Vehikel A:	0,9 % Kochsalzlösung	(n = 5)
6.	Vehikel B:	0,02 M Zitronensäure	(n = 5)

Ergebnisse

1.15 Studie I: Dextromethorphan und Tirilazad

Es wurde bereits erläutert, dass aufgrund der verschiedenen Lösungsmittel zwei Kontrollgruppen (je n=5) gebildet wurden. Nachdem sich die Tiere, die NaCl oder Zitronensäure erhalten hatten, hinsichtlich aller erhobener Parameter (physiologische Parameter, Laser-Doppler Flowmetrie, Neuro-Score, Gewichtsentwicklung, Infarktvolumen) statistisch nicht signifikant unterschieden, wurden diese Tiere zu einer Kontrollgruppe (n=10) zusammengefasst. Im weiteren wird somit nicht mehr zwischen Vehikel A und Vehikel B unterschieden.

1.15.1 Physiologische Kontrollparameter

Der Blutdruck war in allen Gruppen annähernd konstant. Während der Reperfusion zeigte sich ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Abfall. Signifikante Unterschiede bestanden weder zwischen den Therapiegruppen, noch zur Kontrollgruppe. Es bestand ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich Blutgase, Hämoglobin, Hämatokrit, Glukose, rektaler Körpertemperatur ($Temp._R$) und subtemporaler Temperatur ($Temp._T$).

Die Auswertung der physiologischen Kontrollparameter ist in **Tabelle 1** aufgelistet. Die Parameter der Perioden vor, während und nach der Ischämie sind jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben.

Vor Ischämie	**Vehikel**	**Dextromethorphan**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	36,9 ± 5,1	38,4 ± 4,7	38,3 ± 4,4	39,0 ± 4,5
PaO_2 [mmHg]	116,1 ± 14,0	113,8 ± 11,2	107,1 ± 16,7	110,7 ± 11,6
pH	7,40 ± 0,02	7,42 ± 0,05	7,39 ± 0,04	7,40 ± 0,04
Glukose [mmol/L]	79,5 ± 12,8	84,6 ± 14,6	84,5 ± 10,3	80,9 ± 7,7
MABD [mmHg]	92,8 ± 8,9	89,4 ± 8,8	91,0 ± 7,3	87,6 ± 11,3
Hb [g/dL]	15,3 ± 0,9	15,0 ± 1,2	15,4 ± 0,9	15,9 ± 0,7
Hämatokrit [%]	44,9 ± 3,0	44,4 ± 3,4	45,3 ± 2,3	46,7 ± 2,2
$Temp._R$ [°C]	36,9 ± 0,2	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,2	37,0 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01
Während Ischämie	**Vehikel**	**Dextromethorphan**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	38,8 ± 4,9	41,8 ± 5,7	37,8 ± 5,1	40,4 ± 4,8
PaO_2 [mmHg]	117,5 ± 16,2	113,4 ± 14,9	107,2 ± 11,1	106,8 ± 10,3
pH	7,42 ± 0,03	7,39 ± 0,03	7,43 ± 0,04	7,39 ± 0,03
Glukose [mmol/L]	75,6 ± 13,2	74,2 ± 11,4	79,7 ± 9.3	73,2 ± 7,8
MABD [mmHg]	93,4 ± 6,6	87,6 ± 5,8	92,3 ± 5,7	91,7 ± 8,2
Hb [g/dL]	15,1 ± 0,7	14,6 ± 0,9	14,9 ± 1,2	15,3 ± 0,9
Hämatokrit [%]	44,7 ± 1,9	43,2 ± 2,7	43,9 ± 3,5	45,4 ± 2,5
$Temp._R$ [°C]	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,2	37,0 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,02	37,0 ± 0,01
Nach Ischämie	**Vehikel**	**Dextromethorphan**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	40,1 ± 5,5	41,2 ± 6,2	37,4 ± 2,8	39,8 ± 1,9
PaO_2 [mmHg]	111,2 ± 12,7	107,5 ± 12,6	112,6 ± 8,3	106,0 ± 10,0
pH	7,38 ± 0,04	7,37 ± 0,04	7,43 ± 0,03	7,38 ± 0,02
Glukose [mmol/L]	71,0 ± 11,7	66,2 ± 7,8	75,6 ± 13,0	64,9 ± 7,5
MABD [mmHg]	90,3 ± 8,0	85,1 ± 9,7	89,4 ± 9,6	86,4 ± 12,1
Hb [g/dL]	15,0 ± 0,6	14,5 ± 0,6	14,9 ± 0,9	15,2 ± 0,7
Hämatokrit [%]	44,2 ± 3,0	42,9 ± 2,0	44,0 ± 2,9	44,4 ± 2,2
$Temp._R$ [°C]	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01

Tabelle 1: Physiologische Kontrollparameter Mittelwert ± Standardabweichung (SD)

MABD = mittlerer arterieller Blutdruck; Hb = Hämoglobin; $Temp._R$ = Temperatur rektal; $Temp._T$ = Temperatur subtemporal.

1.15.2 Zerebraler Blutfluss

Der zerebrale Blutfluss wurde ca. 30 Minuten vor Beginn der Ischämie bis 1 Stunde nach Beginn der Reperfusion mittels Laser-Doppler Flowmetrie kontinuierlich aufgezeichnet. Der Blutfluss ist in **Abbildung 15** graphisch dargestellt. Unmittelbar nach dem Gefäßverschluss fiel das ipsilaterale LD-Signal - gemessen über der ischämischen Hemisphäre - auf etwa 20 - 25 % des Ausgangswertes ab. Während der 90-minütigen Okklusion blieb der Blutfluss konstant niedrig. Nachdem durch Zurückziehen des Fadens die Reperfusionsphase eingeleitet wurde, kam es zu einer kurzen hyperämischen Periode von ca. fünf Minuten, in der Werte von ungefähr 110 - 130 % des Ausgangswertes erreicht wurden. Im Anschluss daran trat eine verzögerte postischämische Hypoperfusion des betroffenen Hirnareals auf. Der Blutfluss der kontralateralen Hemisphäre blieb während der gesamten Aufzeichnungsperiode unbeeinflusst und bewegte sich im Bereich der Baseline.

Die verzögerte Hypoperfusion blieb bei Kontrolltieren und Tieren, die mit Tirilazad behandelt wurden, bis zum Schluss der Aufzeichnung bestehen. In der Dextromethorphan-Monotherapiegruppe als auch in der Kombinationsgruppe zusammen mit Tirilazad zeigte sich eine signifikante Verbesserung der postischämischen Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt war in der Monotherapie stärker ausgeprägt als bei der Kombinationstherapie.

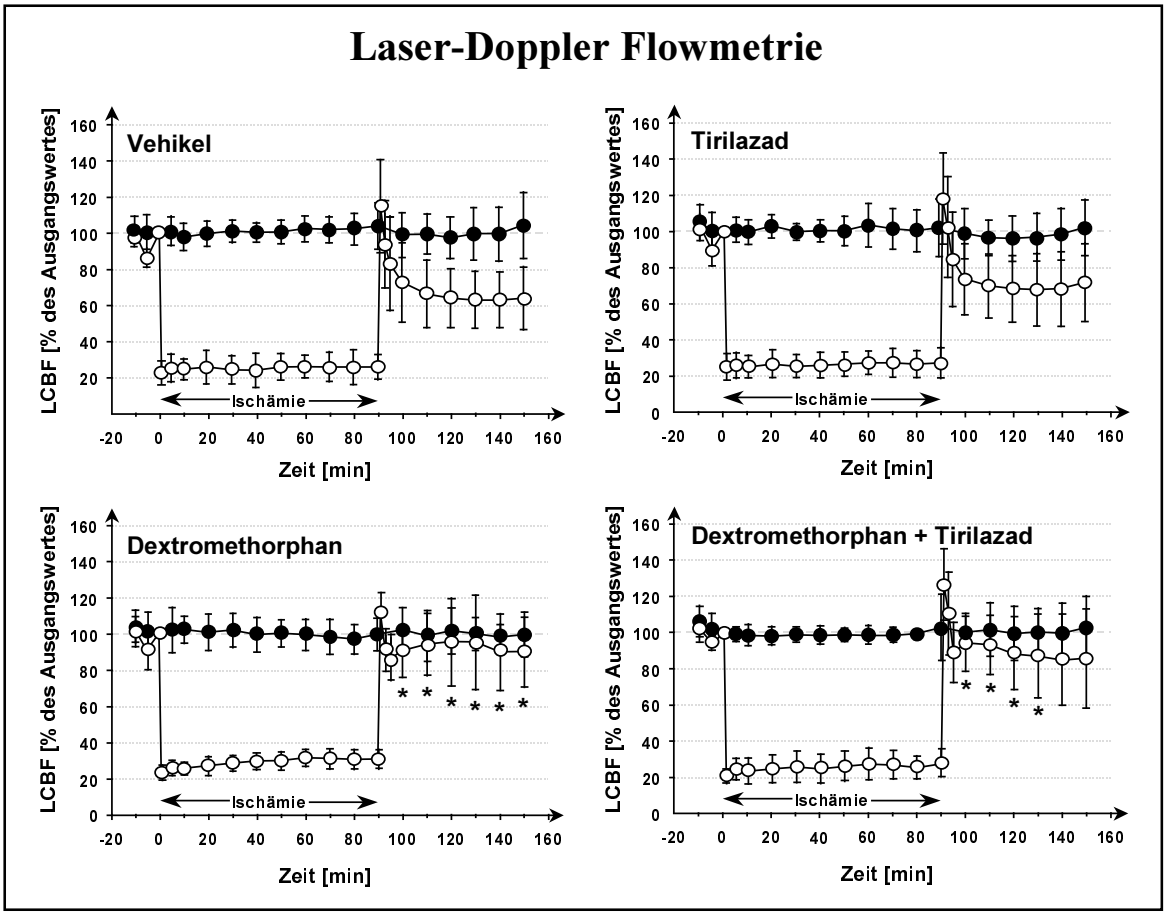

Abbildung 15: Laser-Doppler Flowmetrie (LDF)

Die Graphen stellen dynamische Veränderungen des ipsilateralen und kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) bei 90 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion, mittels kontinuierlicher LDF (2 Hz) gemessen, dar. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswert, MW ± SD) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten und mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie bzw. Reperfusion. Der kurze Abfall im ipsilateralen LCBF kurz vor der Ischämie ist bedingt durch die transiente Okklusion der A. carotis communis beim Einführen des Fadens.

*** p < 0,05** versus Kontrolle für jeden Zeitpunkt.

1.15.3 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite

Während des siebentägigen postoperativen Beobachtungszeitraums wurden das Körpergewicht sowie die entstandenen funktionellen Defizite täglich bestimmt. In allen Gruppen hatten die Versuchstiere am ersten postoperativen Tag ca. 5 - 8 % des präoperativ erhobenen Ausgangsgewichts verloren. Im weiteren Verlauf stellte sich mit unterschiedlich langer Verzögerung wieder eine Gewichtszunahme ein. Die Versuchstiere, die mit Tirilazad behandelt wurden, zeigten die beste Gewichtsentwicklung, während die Kombinationsgruppe die geringste Gewichtszunahme aufwies. Als einzige Gruppe erreichte die Kombinationsgruppe das Ausgangsgewicht nicht. Trotz dieser verlangsamten Gewichtsentwicklung bestanden aufgrund interindividueller Schwankungen zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. **Abbildung 16**).

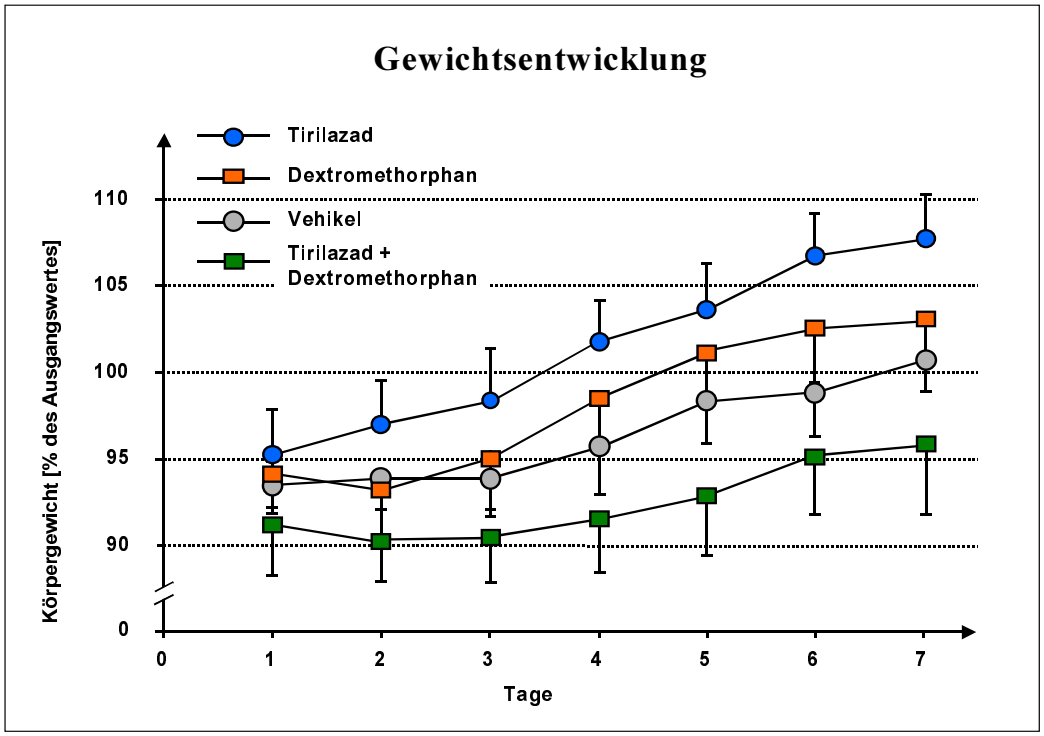

Abbildung 16: Gewichtsentwicklung im postoperativen Verlauf.

Das Körpergewicht ist aufgetragen in % des Ausgangsgewichts (MW ± SD). Als einzige Gruppe erreichte die Kombinationsgruppe ihr Ausgangsgewicht nicht. Die Tirilazad-Monotherapie hatte den günstigsten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung. Bei Signifikanzniveau **$p < 0,05$** zeigten sich keine statistischen Unterschiede.

Ein gesundes, neurologisch unauffälliges Tier hat einen Neuro-Score von 5. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Verlauf der neurologischen Defizite mit dem morphologischen Nervenzellschaden korreliert. Insbesondere nach einer postoperativen Beobachtungsphase von mindestens drei Tagen steigt die Aussagekraft von neurologischen Tests.[337] An der graphischen Darstellung der funktionellen Erholung zeigt sich, dass die Tiere aller Gruppen durch die Ischämie erhebliche neurologische Defizite erlitten. Im Verlauf der sieben Tage zeigten alle Gruppen eine neurologische Verbesserung, die bei den Tieren mit Monotherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert war (Dextromethorphan: Tag 3-7; Tirilazad: Tag 2-7). Die Kombination aus beiden Pharmaka führte zu keiner signifikanten Verbesserung der funktionellen Defizite (s. **Abbildung 17**).

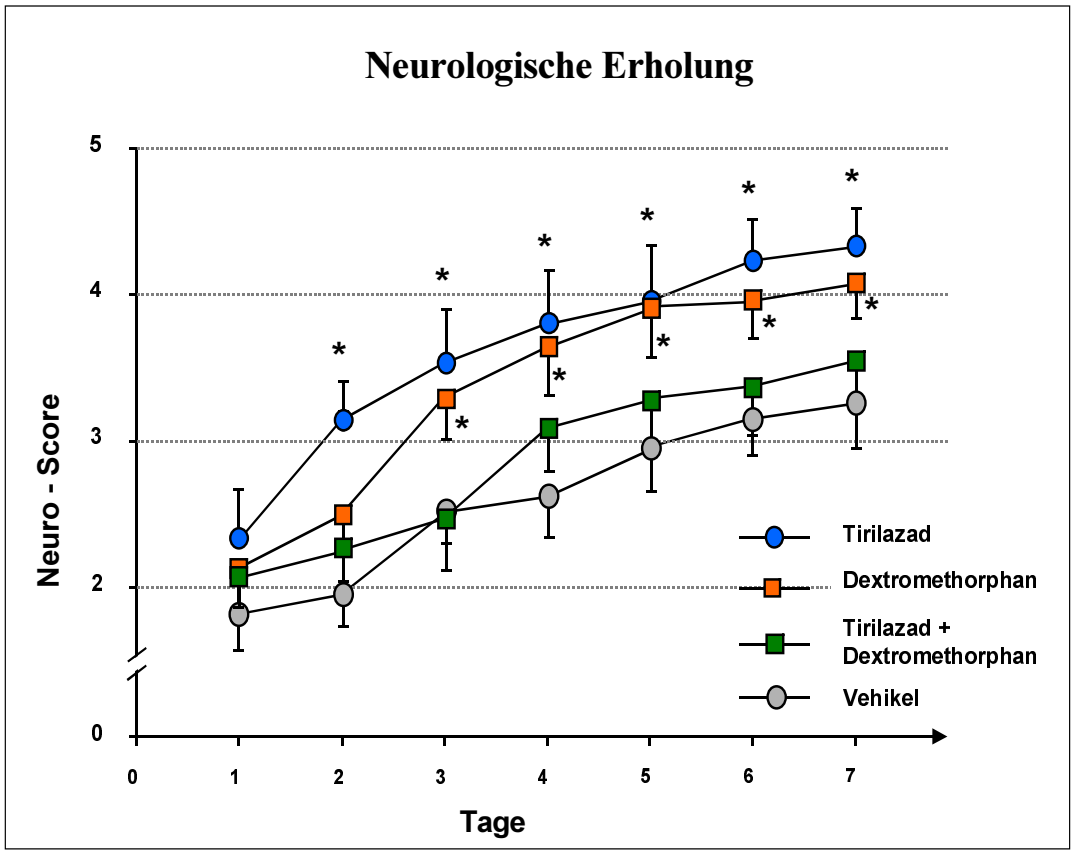

Abbildung 17: Neurologische Erholung im postoperativen Verlauf

* Signifikant weniger neurologische Defizite im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel):
Tirilazad: Tag 2 – 7 Dextromethorphan: Tag 3 – 7 Kombination: ---

Signifikanzniveau: **$p < 0,05$**. MW ± SEM.

1.15.4 Histomorphologischer Schaden

Am 7. Tag nach dem mikrochirurgischen Eingriff wurde das Gehirn der Tiere entnommen und histologisch aufgearbeitet. Durch Vermessung der Infarktareale wurden sowohl das gesamte Infarktvolumen als auch die infarzierten Teilvolumina in den Stammganglien und im Kortex berechnet.

1.15.4.1 Gesamtes Infarktvolumen

Das Gesamtinfarktvolumen bei den Kontrolltieren betrug 68,4 ± 17,9 mm^3 (MW ± SD). Das Infarktvolumen bei Versuchstieren, die mit Tirilazad-Monotherapie behandelt wurden, betrug 35,7 ± 12,8 mm^3 und bei Tieren, die mit Dextromethorphan-Monotherapie behandelt wurden, 37,8 ± 14,7 mm^3. Dies entspricht bei beiden Monotherapien einer statistisch signifikanten Reduktion des Infarktvolumens (Tirilazad: -48%, Dextromethorphan: -45%) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombinationstherapie mit Tirilazad und Dextromethorphan konnte das Gesamtinfarktvolumen (60,1 ± 22,5 mm^3) nicht signifikant reduzieren (-12%) (s. **Abbildung 18**).

1.15.4.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien

Die Vermessung der infarzierten Areale in den Basalganglien zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe (33,9 ± 3,4 mm^3) ebenfalls bei beiden Monotherapien eine signifikante Reduktion des Infarktvolumen (Tirilazad: 19,2 ± 7,4 mm^3 ≅ -43%) (Dextromethorphan: 20,2 ± 6,2 mm^3 ≅ -40%). Die Reduktion des Infarktvolumens in den Basalganglien durch die Kombinationstherapie mit Dextromethorphan und Tirilazad auf 31,1 ± 5,6 mm^3 (-8%) war nicht signifikant.

Tirilazad- und Dextromethorphan-Monotherapie reduzierten auch das kortikale Infarktvolumen signifikant auf 16,7 ± 8,8 mm^3 (-51%) und 18,3 ± 8,2 mm^3 (-46%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (34,2 ± 14,3 mm^3). Die Reduktion des kortikalen Infarktvolumens durch die Kombinationstherapie mit beiden Pharmaka auf 29,5 ± 13,8 mm^3 (-14%) war erneut nicht signifikant (s. **Abbildung 19**).

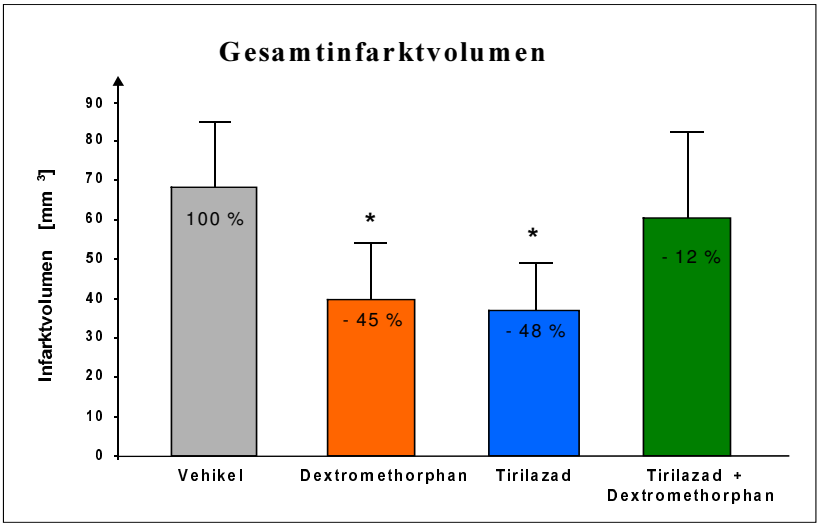

Abbildung 18: Infarktvolumen gesamt

Reduktion des Gesamtinfarktvolumens (mm^3, MW ± SD) durch Dextromethorphan (DM), Tirilazad und Kombinationstherapie mit DM und Tirilazad am 7. postoperativen Tag.

*** p < 0,05** versus Kontrolle (n = 10 in jeder Gruppe)

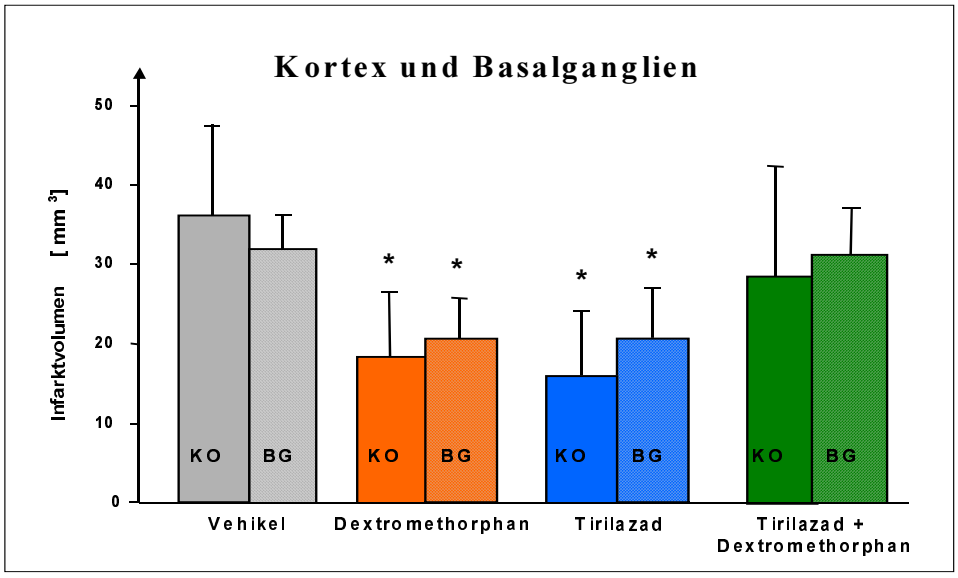

Abbildung 19: Infarktvolumen im Kortex und in den Basalganglien

Reduktion des Infarktvolumens (mm^3, MW ± SD) im Kortex (KO) und in den Basalganglien (BG) durch Dextromethorphan (DM), Tirilazad und die Kombinationstherapie mit DM und Tirilazad am 7. postoperativen Tag.

*** p < 0,05** versus Kontrolle (n = 10 in jeder Gruppe)

1.16 Studie II: Magnesium und Tirilazad

Nachdem sich die Kontrolltiere, die NaCl oder Zitronensäure erhalten hatten, hinsichtlich aller erhobenen Parameter (physiologische Parameter, Laser-Doppler Flowmetrie, Neuro-Score, Gewichtsentwicklung, Infarktvolumen) statistisch nicht signifikant unterschieden, wurden diese Tiere zu einer Kontrollgruppe (n=10) zusammengefasst. Im weiteren wird somit nicht mehr zwischen Vehikel A und Vehikel B unterschieden.

1.16.1 Physiologische Kontrollparameter

Hinsichtlich der physiologischen Kontrollparameter bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Während der Infusion von $MgCl_2$ fiel der Blutdruck um 10-15 mmHg. Die in **Tabelle 2** aufgelisteten Durchschnittswerte wurden jedoch nicht signifikant beeinträchtigt. Bei den Tieren, die Magnesium als Medikament erhalten hatten, zeigte sich außerdem ein Trend zu erhöhten Blutzuckerwerten. Während bei den Kontrolltieren und den mit Tirilazad-Monotherapie behandelten Versuchstieren im Verlauf des Experiments der Blutglukosespiegel abfiel, stiegen die Glukosewerte der Tiere, die mit $MgCl_2$ behandelt wurden an. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Vor Ischämie	**Vehikel**	**$MgCl_2$**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	39,0 ± 4,6	41,3 ± 3,0	38,8 ± 4,4	37,1 ± 3,3
PaO_2 [mmHg]	120,4 ± 12,0	118,4 ± 17,1	120,3 ± 15,8	113,7 ± 14,4
pH	7,40 ± 0,03	7,39 ± 0,02	7,41 ± 0,02	7,41 ± 0,02
Glukose [mmol/L]	82,8 ± 16,2	79,1 ± 11,1	88,2 ± 11,4	84,9 ± 10,2
MABD [mmHg]	96,1 ± 6,9	92,7 ± 11,4	97,7 ± 9,3	94,7 ± 11,1
Hb [g/dL]	15,2 ± 1,5	15,8 ± 0,9	15,4 ± 0,9	15,3 ± 1,2
Hämatokrit [%]	45,0 ± 2,1	47,5 ± 1,9	45,3 ± 2,0	45,1 ± 2,1
$Temp._R$ [°C]	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1	36,9 ± 0,1	36,9 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01
Während Ischämie	**Vehikel**	**$MgCl_2$**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	40,2 ± 5,4	38,9 ± 3,6	39,7 ± 3,6	37,2 ± 3,3
PaO_2 [mmHg]	118,5 ± 26,1	117,5 ± 14,7	119,2 ± 18,9	118,6 ± 15,6
pH	7,38 ± 0,02	7,39 ± 0,01	7,39 ± 0,01	7,40 ± 0,02
Glukose [mmol/L]	79,2 ± 14,7	82,8 ± 10,3	84,6 ± 11,9	85,5 ± 13,6
MABD [mmHg]	97,7 ± 8,7	97,1 ± 8,7	99,8 ± 9,0	97,7 ± 8,7
Hb [g/dL]	14,7 ± 1,2	15,5 ± 0,9	15,1 ± 0,9	15,0 ± 0,9
Hämatokrit [%]	44,3 ± 1,7	46,2 ± 2,4	44,7 ± 2,1	44,2 ± 1,6
$Temp._R$ [°C]	37,1 ± 0,2	36,9 ± 0,2	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,2
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01
Nach Ischämie	**Vehikel**	**$MgCl_2$**	**Tirilazad**	**Kombination**
$PaCO_2$ [mmHg]	41,6 ± 4,8	36,5 ± 5,1	37,3 ± 4,5	35,0 ± 4,5
PaO_2 [mmHg]	115,9 ± 10,2	115,2 ± 11,4	120,9 ± 15,9	110,1 ± 15,0
pH	7,37 ± 0,02	7,40 ± 0,01	7,40 ± 0,02	7,41 ± 0,02
Glukose [mmol/L]	76,4 ± 13,8	86,1 ± 15,3	79,0 ± 13,8	86,4 ± 17,7
MABD [mmHg]	92,7 ± 10,2	91,4 ± 9,0	93,3 ± 8,4	91,2 ± 9,3
Hb [g/dL]	14,2 ± 1,5	15,4 ± 0,9	14,9 ± 1,2	14,7 ± 0,9
Hämatokrit [%]	43,2 ± 2,5	45,4 ± 1,7	44,1 ± 2,0	43,3 ± 2,1
$Temp._R$ [°C]	37,1 ± 0,1	36,9 ± 0,1	36,9 ± 0,1	37,0 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,01

Tabelle 2: Physiologische Kontrollparameter Mittelwert ± Standardabweichung (SD)

MABD = mittlerer arterieller Blutdruck; Hb = Hämoglobin; $Temp._R$ = Temperatur rektal; $Temp._T$ = Temperatur subtemporal.

1.16.2 Zerebraler Blutfluss

Die Okklusion der Arteria cerebri media führte in allen Gruppen zu einem Abfall des ipsilateralen LD-Signals auf Werte von ca. 25% des Ausgangswertes. Bei allen Gruppen trat bei Reperfusion initial eine Hyperämie im ischämischen Areal auf, gefolgt von einer verzögerten postischämischen Hypoperfusion. Diese pendelte sich bei Flusswerten zwischen 60 und 80 % des Ausgangswertes ein, und persistierte in allen Gruppen bis zum Ende der Aufzeichnungsperiode. Die Perfusion der kontralateralen Hemisphäre war während der Operation unbeeinflusst. Der statistische Vergleich ergab keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. **Abbildung 20**).

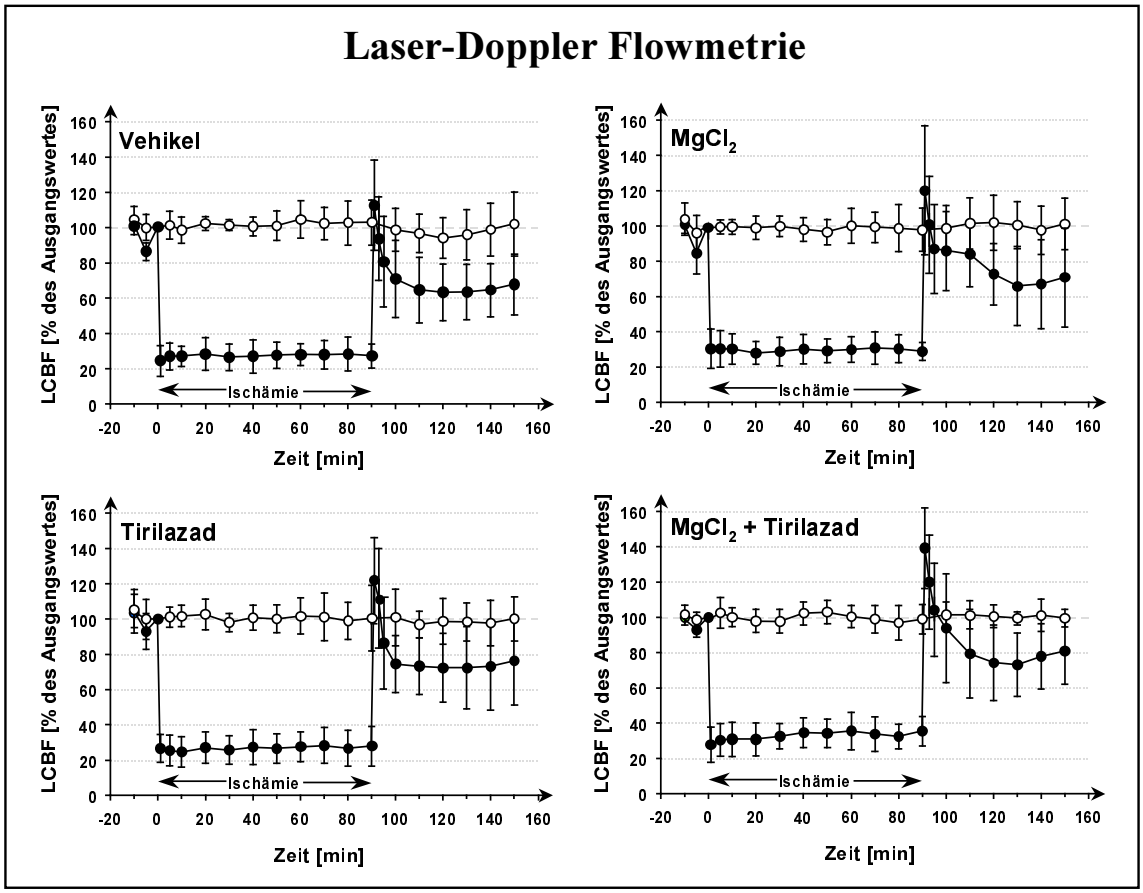

Abbildung 20: Laser-Doppler Flowmetrie (LDF)

Die Graphen stellen dynamische Veränderungen des ipsilateralen und kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) bei 90 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion, mittels kontinuierlicher LDF (2 Hz) gemessen, dar. Die aufgetragenen Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswert, MW ± SD) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten und mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie bzw. Reperfusion. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

1.16.3 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite

Im Verlauf der postoperativen Beobachtungsphase zeigten Versuchstiere, die mit der Kombination $MgCl_2$ + Tirilazad behandelt worden waren, die beste Gewichtsentwicklung, gefolgt von den beiden Monotherapien. Die Kontrollgruppe wies vor allem im Vergleich zur Kombinationsgruppe eine verzögerte Gewichtszunahme auf. Aufgrund der interindividuellen Schwankungen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (s. **Abbildung 21**).

Versuchstiere, die mit Tirilazad- oder $MgCl_2$-Monotherapie behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren am 3. und 4. postoperativen Tag signifikant weniger stark ausgeprägte neurologische Defizite. Versuchstiere, die mit der Kombination beider Pharmaka behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant weniger funktionelle Defizite vom zweiten bis siebten postoperativen Tag. Am letzten Tag des Versuchs hatte nur noch ein Tier der Kombinationsgruppe neurologische Ausfälle (s. **Abbildung 22**).

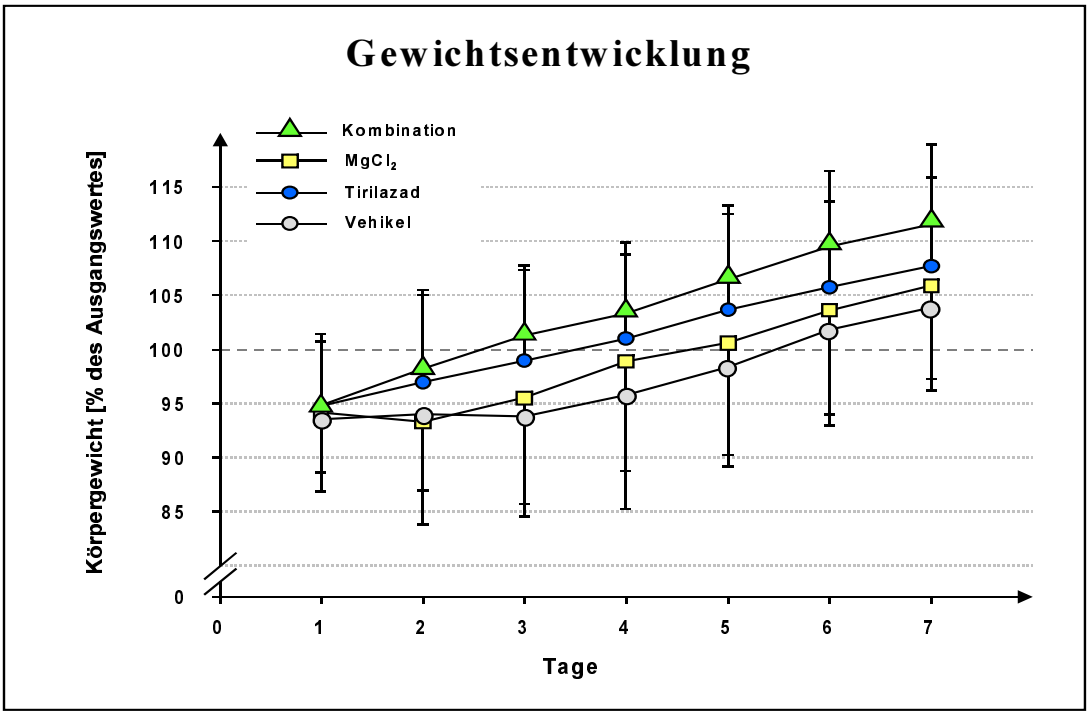

Abbildung 21: Gewichtsentwicklung im postoperativen Verlauf.
Das Körpergewicht ist aufgetragen in % des Ausgangsgewichts (MW ± SD). Alle Gruppen erreichten nach wenigen Tagen das präoperative Ausgangsgewicht. Bei Signifikanzniveau **$p < 0,05$** zeigten sich keine statistischen Unterschiede.

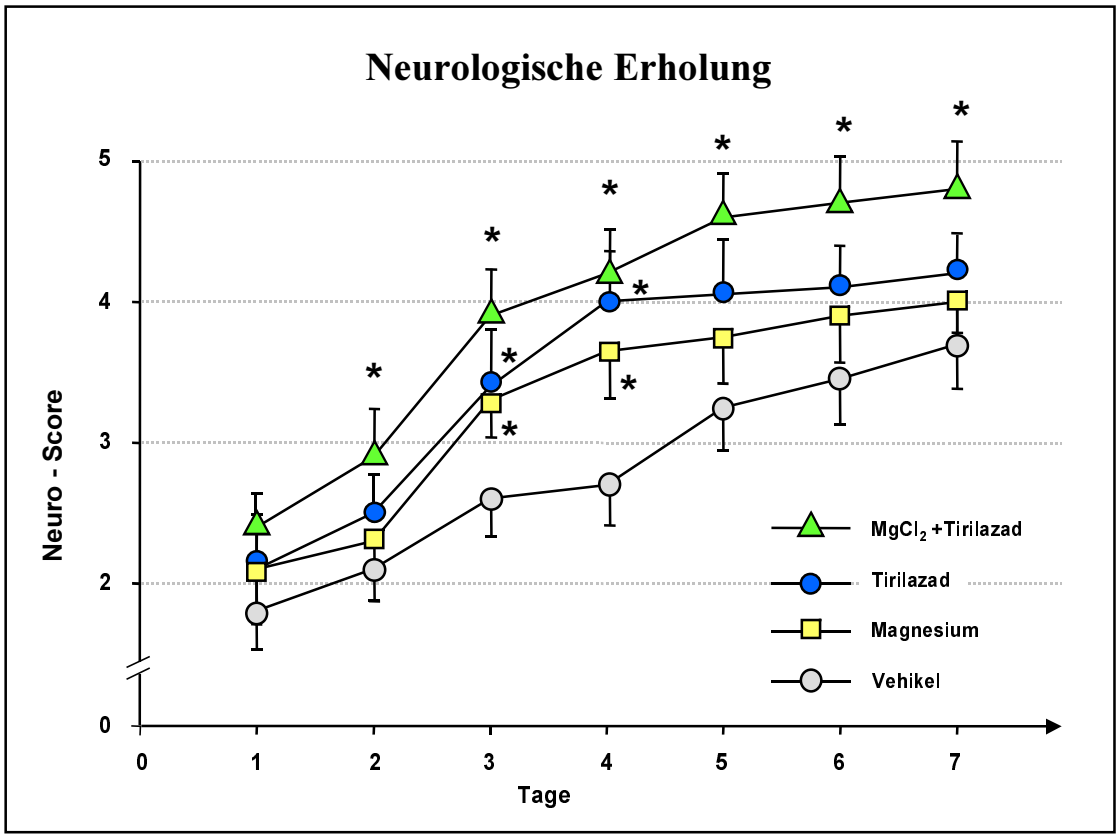

Abbildung 22: Neurologische Erholung im postoperativen Verlauf

* Signifikant weniger neurologische Defizite im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel):
Tirilazad: Tag 3 + 4 Magnesium: Tag 3 + 4 Kombination: Tag 2 - 7

Signifikanzniveau: **p < 0,05**. MW ± SEM.

1.16.4 Histomorphologischer Schaden

1.16.4.1 Gesamtes Infarktvolumen

Das Gesamtinfarktvolumen der Kontrollgruppe betrug 65,8 ± 21,2 mm^3 (MW ± SD), 34,5 ± 17,1 mm^3 bei den Versuchstieren, die mit Tirilazad-Monotherapie behandelt worden waren, 49,3 ± 18,4 mm^3 bei den Versuchstieren, die mit $MgCl_2$-Monotherapie behandelt worden waren und 27,1 ± 7,9 mm^3 bei den Versuchstieren, die mit beiden Pharmaka

behandelt worden waren (s. **Abbildung 23**). Die Reduktion des Gesamtinfarktvolumens durch Tirilazad als Monotherapie (-48%) und durch die Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ und Tirilazad (-59%) war im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant. Die Monotherapie mit $MgCl_2$ resultierte in einer nicht-signifikanten Reduktion des gesamten Infarktvolumens (-25%).

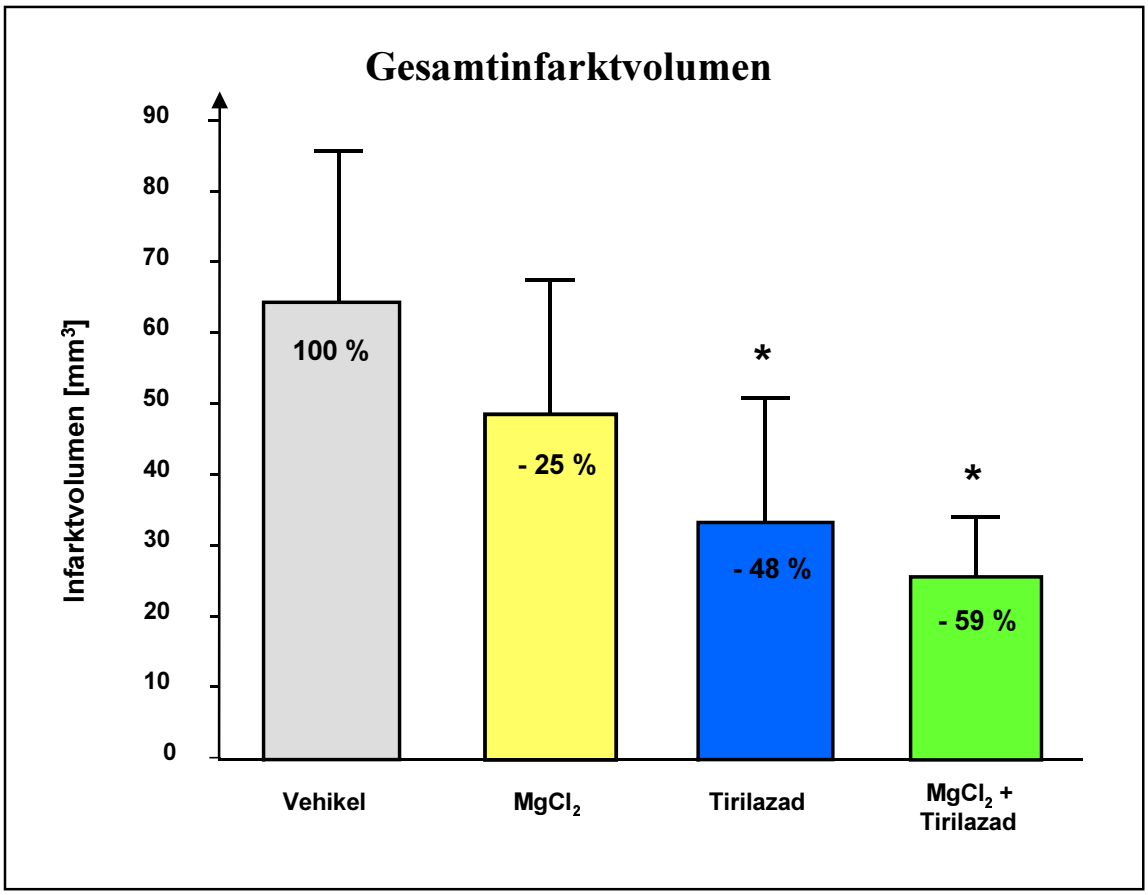

Abbildung 23: Gesamtinfarktvolumen

Reduktion des Gesamtinfarktvolumens (mm^3, MW ± SD) durch $MgCl_2$, Tirilazad und Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ und Tirilazad am 7. postoperativen Tag.

* **p < 0,05** versus Kontrolle (n = 10 in jeder Gruppe)

1.16.4.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien

Die Auswertung des kortikalen Infarktvolumens zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion durch $MgCl_2$-Monotherapie, Tirilazad-Monotherapie und die Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ und Tirilazad. Das kortikale Infarktvolumen betrug 35,2 ± 14,8 mm^3 bei den Kontrolltieren, 22,3 ± 12,0 mm^3 (-37%) bei den Versuchstieren, die mit $MgCl_2$-Monotherapie behandelt worden waren und 15,9 ± 10,2 mm^3 (-55%) bei den Versuchstieren, die mit Tirilazad-Monotherapie behandelt worden waren. Die Kombinationstherapie mit beiden Pharmaka bewirkte eine Abnahme des kortikalen Infarktvolumens auf 9,8 ± 5,8 mm^3 (-72%).

Die Reduktion des Infarktvolumens in den Basalganglien war insgesamt weniger stark ausgeprägt. Tirilazad-Monotherapie und die Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ + Tirilazad reduzierten signifikant das Infarktvolumen in den Basalganglien auf 18,4 ± 7,5 mm^3 (-40%) und 18,5 ± 5,4 mm^3 (-40%) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (30,7 ± 5,3 mm^3). Die Reduktion des Infarktvolumens in den Basalganglien durch $MgCl_2$-Monotherapie auf 26,3 ± 8,0 mm^3 (-14%) war nicht signifikant (s. **Abbildung 24**).

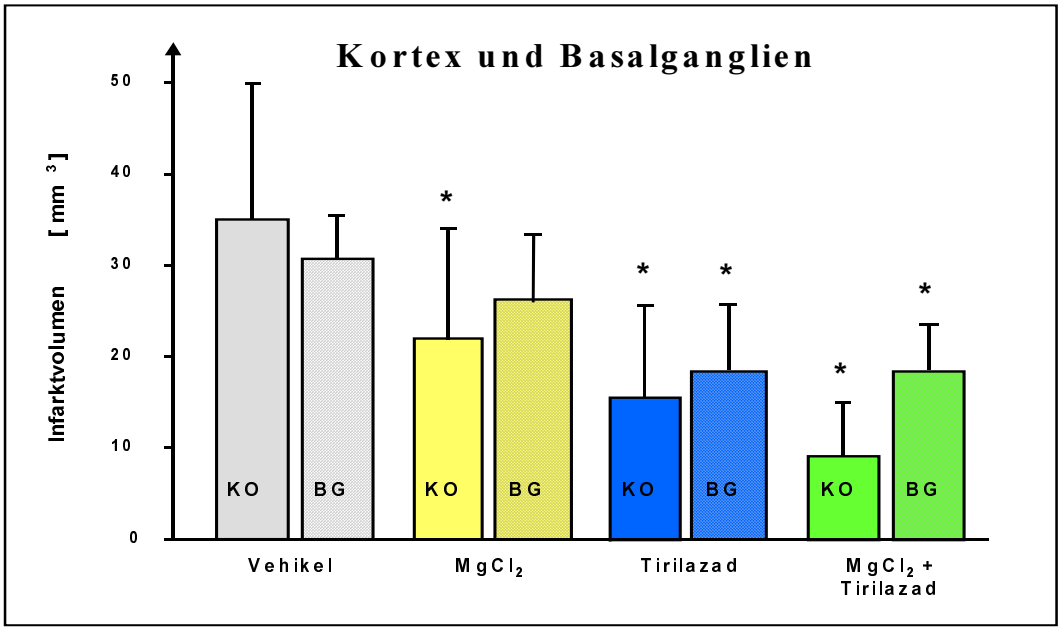

Abbildung 24: Infarktvolumen im Kortex und in den Basalganglien

Reduktion des Infarktvolumens (mm^3, MW ± SD) im Kortex (KO) und in den Basalganglien (BG) durch $MgCl_2$, Tirilazad und Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ und Tirilazad.

*** p < 0,05** versus Kontrolle (n = 10 in jeder Gruppe)

1.17 Studie III: Magnesium, Tirilazad und Hypothermie

Weder bei den normothermen Kontrolltieren noch bei den Kontrolltieren, die mit Hypothermie behandelt wurden, zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Behandlung mit NaCl oder Zitronensäure. Alle erhobenen Parameter (physiologische Parameter, Laser-Doppler Flowmetrie, EEG, Neuro-Score, Gewichtsentwicklung, Infarktvolumen) waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich, so dass diese Tiere in einer normothermen bzw. hypothermen Kontrollgruppe zusammengefasst wurden (je n=10). Im weiteren wird somit nicht mehr zwischen Vehikel A und Vehikel B bzw. Hypothermie A und Hypothermie B unterschieden.

1.17.1 Physiologische Kontrollparameter

Der arterielle Blutdruck, Blutgase, Hämoglobin und Hämatokrit der Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Wie in Studie II fiel während der Infusion von $MgCl_2$ der Blutdruck um 10-15 mmHg ab. Die dargestellten Durchschnittswerte wurden jedoch nicht signifikant beeinträchtigt. Erneut zeigte sich bei den Tieren, die mit Magnesium behandelt wurden, aber auch bei der hypothermen Kontrollgruppe ein Trend zu erhöhten Blutglukosespiegeln. Die Kombinationstherapie mit Tirilazad, $MgCl_2$ und Hypothermie führte zu einem signifikanten Anstieg der Blutzuckerwerte. Ferner zeigten sowohl Tiere der Hypothermie-Gruppe als auch der Kombinationsgruppe mit Tirilazad, $MgCl_2$ und Hypothermie einen Trend zu niedrigeren $PaCO_2$-, höheren PaO_2- und höheren pH-Werten (s. **Tabelle 3**).

Vor Ischämie	**Vehikel 37°C**	**Hypothermie 33°C**	**$MgCl_2$+Tirilazad 37°C**	**$MgCl_2$ +Tirilazad + Hypothermie 33°C**
$PaCO_2$ [mmHg]	39,8 ± 6,2	35,9 ± 7,1	38,2 ± 4,3	35,3 ± 4,2
PaO_2 [mmHg]	123,5 ± 17,1	124,8 ± 26,1	122,6 ± 19,7	126,2 ± 26,9
pH	7,39 ± 0,02	7,43 ± 0,06	7,40 ± 0,02	7,42 ± 0,03
Glukose [mg/dL]	84 ± 14,2	86 ± 15,4	81 ± 13,1	79 ± 9,7
MABD [mmHg]	95,2 ± 6,9	89 ± 5,2	92,1 ± 7,5	91,6 ± 6,8
Hb [g/dL]	15,2 ± 2,2	15,6 ± 1,2	15,5 ± 1,7	15,5 ± 0,8
Hämatokrit [%]	44,9 ± 2,3	45,7 ± 3,6	45,4 ± 2,6	45,5 ± 2,5
$Temp._R$ [°C]	37,0 ± 0,2	33,1 ± 0,1	36,9 ± 0,1	33,1 ± 0,2
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	32,9 ± 0,01	37,0 ± 0,02	33,0 ± 0,04
Während Ischämie	**Vehikel 37°C**	**Hypothermie 33°C**	**$MgCl_2$+Tirilazad 37°C**	**$MgCl_2$ +Tirilazad + Hypothermie 33°C**
$PaCO_2$ [mmHg]	39,2 ± 5,4	35,9 ± 4,2	38,8 ± 6,4	36,1 ± 4,2
PaO_2 [mmHg]	119,4 ± 15,9	125,2 ± 24,1	118,1 ± 16,4	127,9 ± 26,5
pH	7,38 ± 0,03	7,40 ± 0,03	7,39 ± 0,02	7,39 ± 0,04
Glukose [mmol/L]	78 ± 13,9	86 ± 13,7	83 ± 14,8	89 ± 16,3
MABD [mmHg]	91,2 ± 9,1	86,6 ± 4,3	88,4 ± 7,3	86,9 ± 3,1
Hb [g/dL]	14,9 ± 2,4	15,7 ± 1,3	15,3 ± 1,5	15,5 ± 0,8
Hämatokrit [%]	44,6 ± 3,1	46,3 ± 3,8	45,2 ± 3,0	45,5 ± 2,4
$Temp._R$ [°C]	36,9 ± 0,2	33,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1	33,1 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	32,9 ± 0,18	37,0 ± 0,01	33,0 ± 0,23
Nach Ischämie	**Vehikel 37°C**	**Hypothermie 33°C**	**$MgCl_2$+Tirilazad 37°C**	**$MgCl_2$ +Tirilazad + Hypothermie 33°C**
$PaCO_2$ [mmHg]	40,9 ± 4,8	37,2 ± 4,2	38,7 ± 3,9	36,5 ± 4,2
PaO_2 [mmHg]	118,5 ± 16,6	115,2 ± 17,7	118,8 ± 13,4	113,1 ± 10,1
pH	7,36 ± 0,03	7,37 ± 0,03	7,37 ± 0,02	7,36 ± 0,02
Glukose [mmol/L]	74 ± 12,3	90 ± 17,2	94 ± 14,7	108 ± 27,8 *
MABD [mmHg]	90,2 ± 8,9	85,8 ± 6,4	88,4 ± 6,6	87,0 ± 3,7
Hb [g/dL]	14,9 ± 2,0	15,7 ± 1,4	15,2 ± 1,2	15,2 ± 0,9
Hämatokrit [%]	44,5 ± 3,0	46,1 ± 4,0	45,4 ± 2,9	44,7 ± 2,5
$Temp._R$ [°C]	37,0 ± 0,1	36,9 ± 0,2	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,1
$Temp._T$ [°C]	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,05	37,0 ± 0,01	37,0 ± 0,13

Tabelle 3: Physiologische Kontrollparameter Mittelwert ± Standardabweichung (SD)

MABD = mittlerer arterieller Blutdruck; Hb = Hämoglobin; $Temp._R$ = Temperatur rektal; $Temp._T$ = Temperatur subtemporal. Die Kombinationstherapie mit Tirilazad, $MgCl_2$ und Hypothermie führte zu einem signifikanten Anstieg der Blutzuckerwerte im Vergleich zu den Blutzuckerwerten vor Ischämie.

* Signifikanzniveau **$p < 0,05$**.

1.17.2 Zerebraler Blutfluss

Während der präischämischen Aufzeichnungsphase blieb unter normothermen Bedingungen (Kontrollgruppe, Tirilazad + $MgCl_2$-Gruppe) sowohl der ipsilaterale als auch der kontralaterale Blutfluss (LCBF) im Bereich der Baseline. Bei den hypothermen Gruppen fiel der ipsi- und kontralaterale LCBF während der Abkühlphase signifikant auf ca. 80% des Ausgangswertes ab. Bei Okklusion fiel der ipsilaterale LCBF in allen Gruppen auf ca. 20–25% des Ausgangswertes ab, während der kontralaterale LCBF zum Zeitpunkt der Okklusion unverändert blieb. Während der 90-minütigen Okklusion blieb der ipsilaterale Blutfluss konstant niedrig. Bei den normothermen Gruppen war die Reperfusion begleitet von einer kurzen Hyperämie, gefolgt von einem langsamen Abfall des ipsilateralen LCBF auf ca. 70% des Ausgangswertes. Diese postischämische Hypoperfusion persistierte bis zum Ende der Aufzeichnungsperiode, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den normothermen Gruppen bestand. Im Vergleich zu der normothermen Kontrollgruppe war die Reperfusion bei den hypothermen Gruppen charakterisiert durch eine signifikant verlängerte Hyperämie, während die postischämische Hypoperfusion sich nicht signifikant unterschied. Der kontralaterale LCBF erreichte in der Aufwärmphase seinen Ausgangswert (s. **Abbildung 25**).

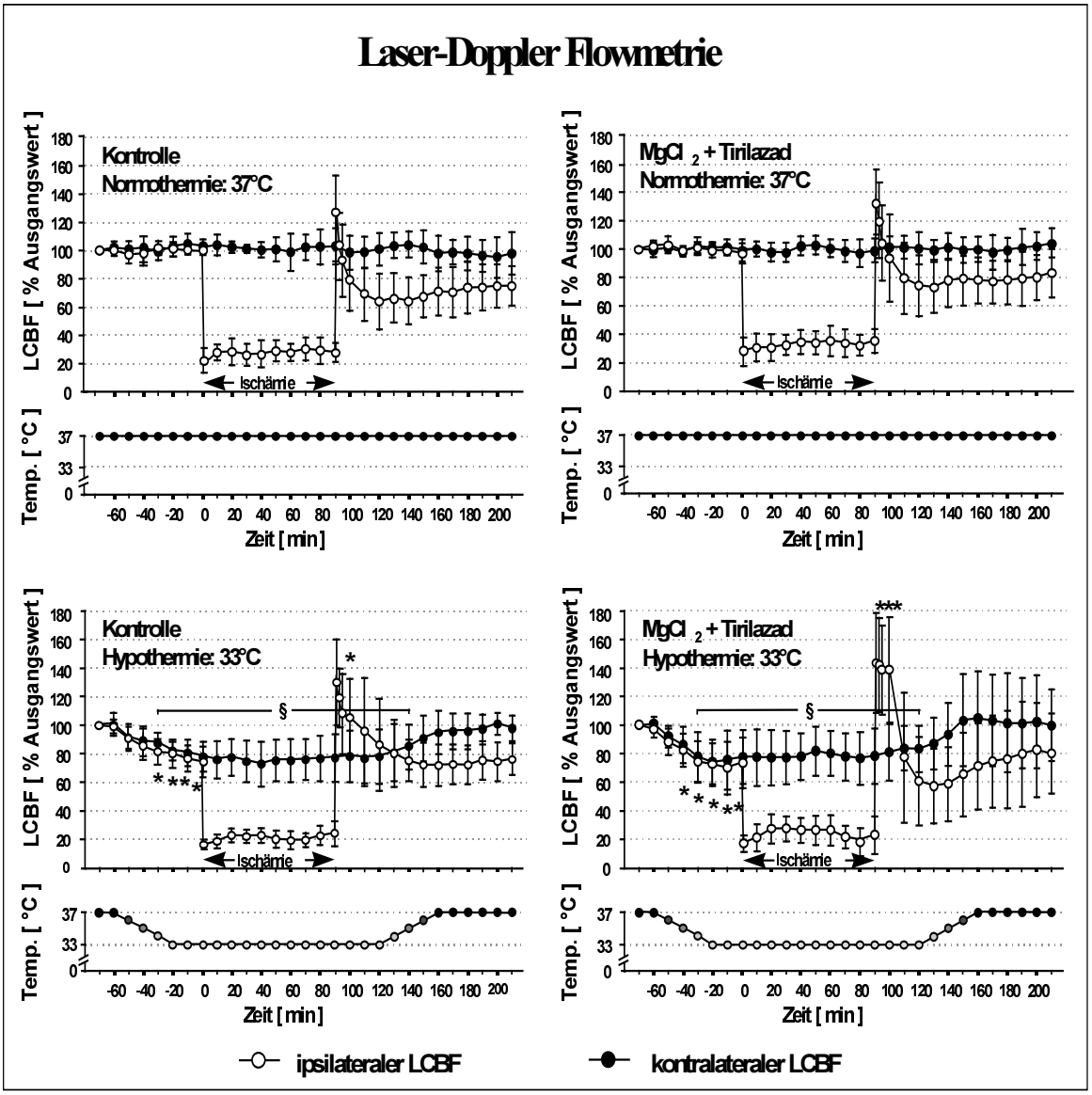

Abbildung 25: Laser-Doppler Flowmetrie und Temperaturverlauf

Die Graphen stellen dynamische Veränderungen des ipsilateralen und kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF), mittels kontinuierlicher LDF (2 Hz) gemessen, von 1 Stunde vor Induktion der Ischämie bis 2 Stunden nach Reperfusion dar. Innerhalb dieses Zeitfensters erfolgt die Abkühlung sowie die Erwärmung der Tiere. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswert, MW ± SD) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie bzw. Reperfusion.

Temp. = Verlauf der subtemporalen Temperatur in °C.

*** p < 0,05** versus ipsilateralem LCBF von normothermen Kontrolltieren für jeden Zeitpunkt.

§ p < 0,05 versus kontralateralem LCBF von normothermen Kontrolltieren für jeden Zeitpunkt.

1.17.3 Elektrophysiologische Erholung

Während der Ableitungsperiode vor Induktion der Ischämie blieb unter normothermen Bedingungen (Kontrollgruppe, Tirilazad + $MgCl_2$-Gruppe) sowohl die ipsilaterale als auch die kontralaterale EEG-Amplitude unverändert. Bei den hypothermen Gruppen fiel die ipsi- und kontralaterale EEG-Amplitude während der Abkühlphase signifikant auf ca. 80% des Ausgangswertes ab. Zum Zeitpunkt der Okklusion der A. cerebri media fiel in allen Gruppen die ipsilaterale EEG-Amplitude mit einer Verzögerung von 4-5 Sekunden auf Werte von ca. 35 - 40 % des Ausgangswertes, während die kontralaterale EEG-Amplitude bei Okklusion sich um 5-10% reduzierte. Im Verlauf der 90-minütigen Okklusion blieb die ipsilaterale EEG-Amplitude konstant niedrig, ebenfalls blieb die kontralaterale EEG-Amplitude unverändert. Nach Reperfusion erholte sich die ipsilaterale EEG-Amplitude der normothermen Kontrollgruppe graduell auf 60% des Ausgangswertes, die Amplitude der Tirilazad + $MgCl_2$-Gruppe auf ca. 73% und die Amplitude der Hypothermie-Gruppe auf ca. 80% des Ausgangswertes. Die EEG-Amplitude der hypothermen Kombinationsgruppe ($MgCl_2$ + Tirilazad + Hypothermie) erholte sich auf ca. 89% des Ausgangswertes. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war diese Erholung signifikant besser. Die kontralaterale EEG-Amplitude der hypothermen Tiere erreichte nach Wiederaufwärmen ihren Ausgangswert (s. **Abbildung 26**).

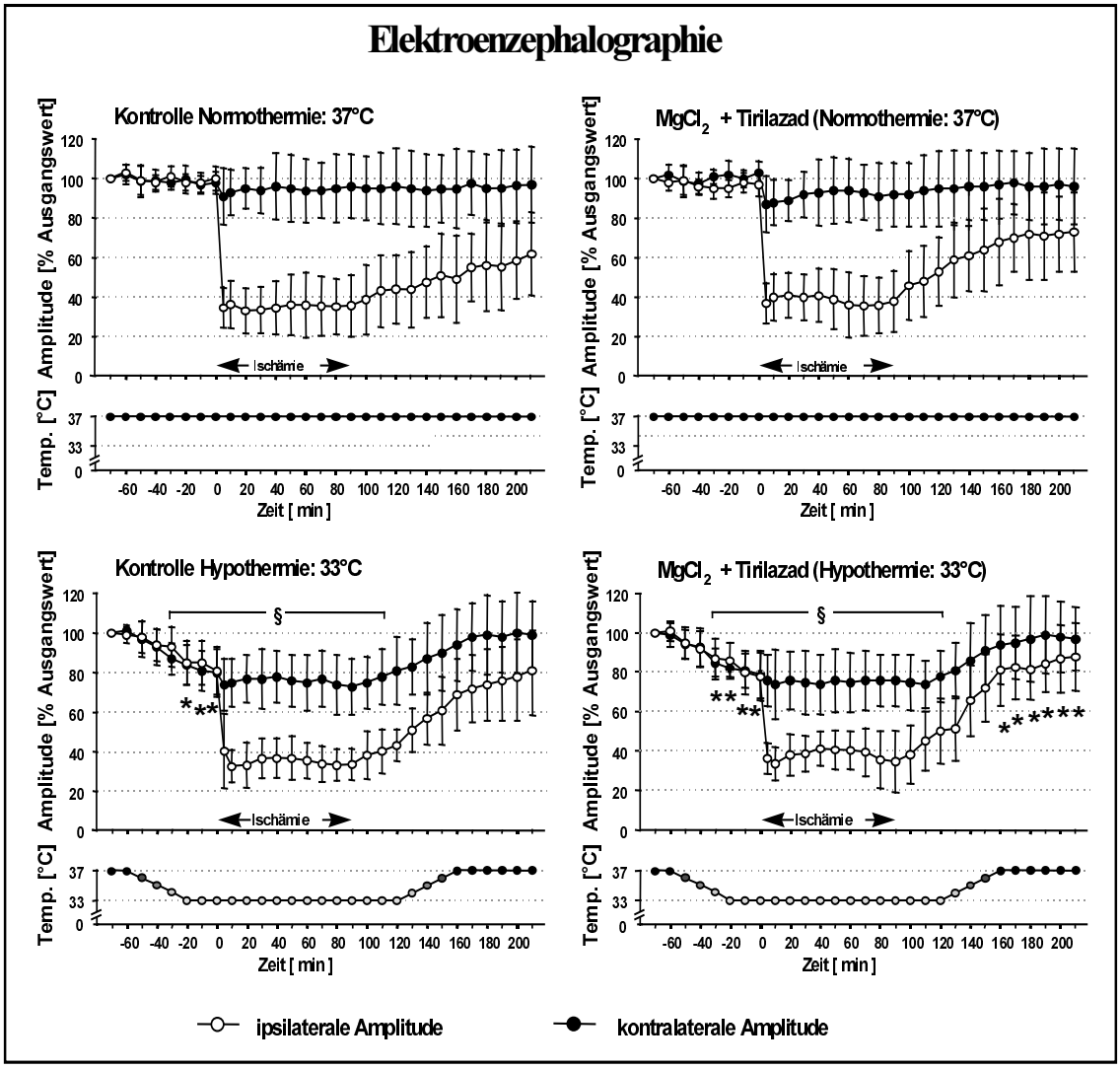

Abbildung 26: EEG-Amplituden und Temperaturverlauf

Die Graphen stellen Veränderungen der ipsilateralen und kontralateralen EEG-Amplitude, beginnend vor Induktion der Hypothermie und Ischämie bis 2 Stunden nach Reperfusion und Erreichen von Normothermie, dar. Die dargestellten Werte sind Durchschnittswerte (% des Ausgangswert, MW ± SD) von 1-minütigen Perioden in einem Intervall von 10 Minuten mit kürzeren Intervallen bei Induktion der Ischämie bzw. Reperfusion.

Temp. = Verlauf der subtemporalen Temperatur in °C.

*** p < 0,05** versus ipsilaterale Amplitude von normothermen Kontrolltieren für jeden Zeitpunkt.

§ p < 0,05 versus kontralaterale Amplitude von normothermen Kontrolltieren für jeden Zeitpunkt.

1.17.4 Gewichtsentwicklung und funktionelle Defizite

Hypotherme Versuchstiere, die zusätzlich mit den Pharmaka $MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren zeigten die beste Gewichtsentwicklung, während die normothermen Kontrolltiere die geringste Gewichtszunahme aufwiesen. Aufgrund von Schwankungen innerhalb der Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied (s. **Abbildung 27**).

Tiere, die mit der Kombination $MgCl_2$ + Tirilazad behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu normothermen Kontrolltieren signifikant weniger ausgeprägte neurologische Defizite vom 4. bis 7. postoperativen Tag. Hypotherme Kontrolltiere zeigten im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe signifikant weniger Defizite vom 3. bis 7. postoperativen Tag. Hypotherme Versuchstiere, die zusätzlich mit der Kombination $MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu normothermen Kontrolltieren signifikant weniger neurologische Ausfälle vom 1. bis 7. postoperativen Tag, wobei am 7. postoperativen Tag kein Tier dieser Gruppe mehr neurologische Defizite aufwies (s. **Abbildung 28**).

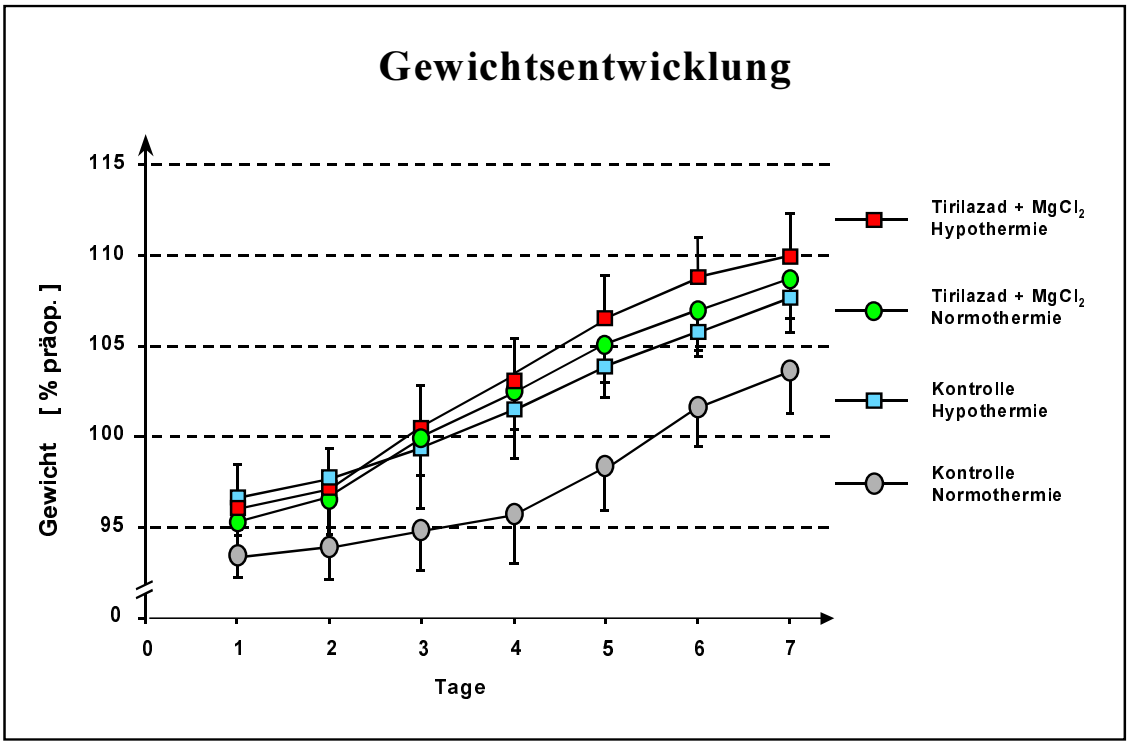

Abbildung 27: Gewichtsentwicklung im postoperativen Verlauf

Die Werte sind als MW ± SD für n=10 in jeder Gruppe angegeben (in % des präoperativen Gewichts). Aufgrund der interindividuellen Schwankungen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

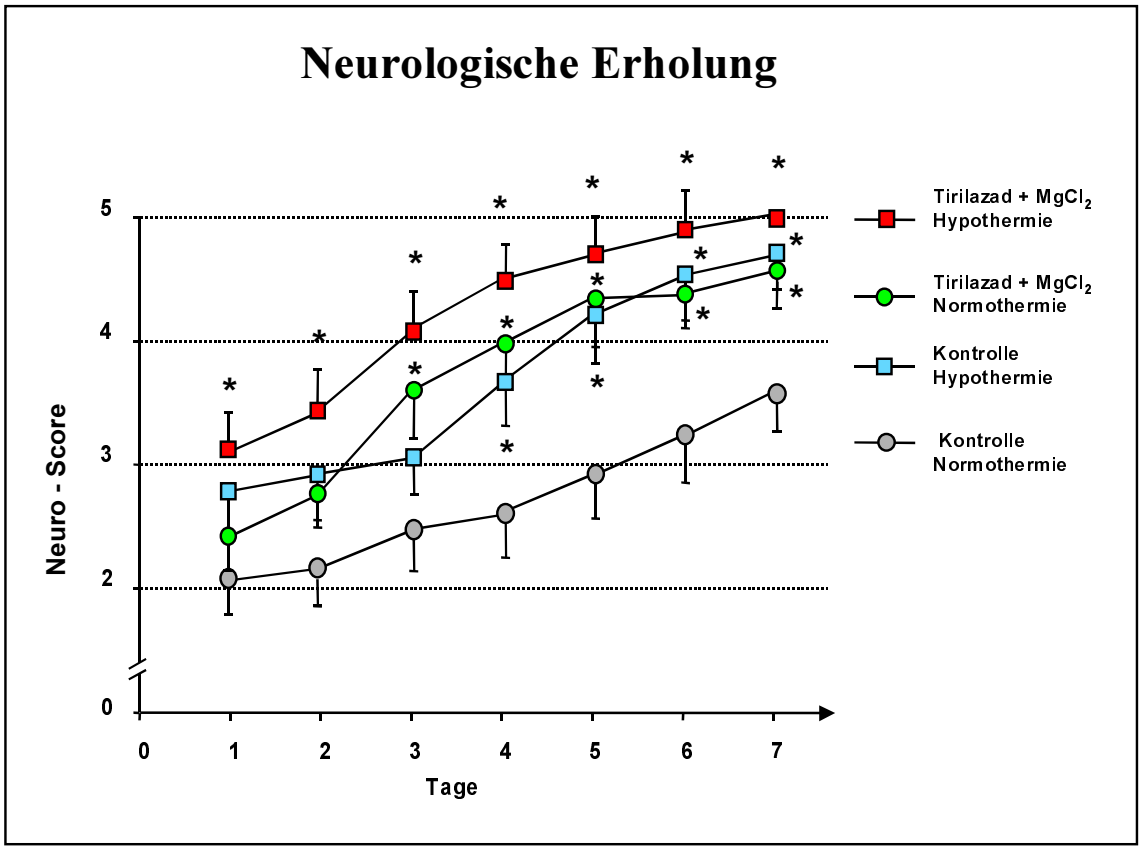

Abbildung 28: Neurologische Erholung im postoperativen Verlauf

Keines der hypothermen Tiere, die zusätzlich mit der Kombination $MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren, hatte am Ende der Beobachtungsperiode residuale neurologische Defizite.

Signifikanzniveau: **$p < 0,05$** MW ± SEM.

*** $p < 0,05$** versus normothermen Kontrolltieren für jeden Tag.

1.17.5 Histomorphologischer Schaden

1.17.5.1 Gesamtes Infarktvolumen

Das Gesamtinfarktvolumen betrug bei der Kontrollgruppe mit Normothermie 70,2 ± 17,4 mm^3 (MW ± SD) und bei der normothermen Kombinationsgruppe ($MgCl_2$ + Tirilazad) 30,8 ± 9,6 mm^3. Das Infarktvolumen der Hypothermie-Gruppe betrug 25,9 ± 12,3 mm^3 und das Infarktvolumen von hypothermen Versuchstieren, die zusätzlich mit der Kombination

$MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren, betrug 15,8 ± 8,2 mm^3. Die Reduktion des gesamten Infarktvolumens war im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe sowohl bei der normothermen Kombinationsgruppe (-56%), bei der reinen Hypothermie-Gruppe (-63%) als auch bei der Gruppe, die mit $MgCl_2$ + Tirilazad + Hypothermie (-77%) behandelt wurden, statistisch signifikant (s. **Abbildung 29**).

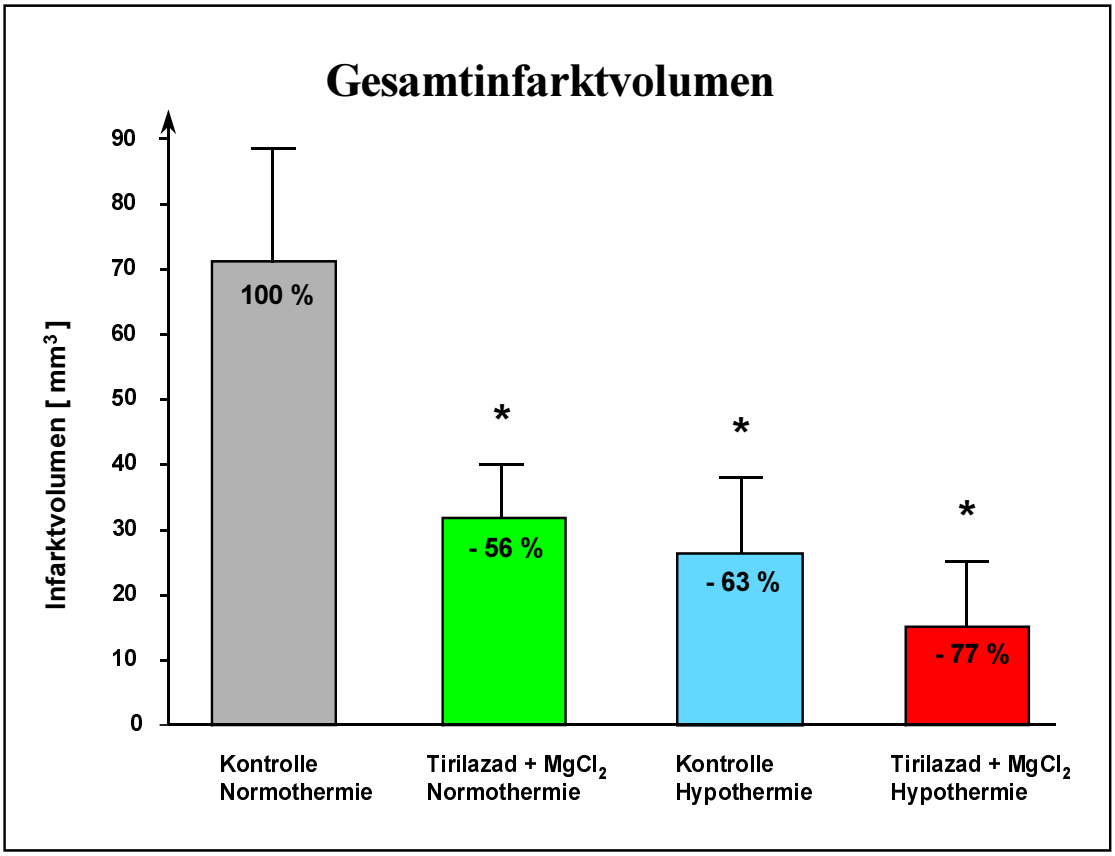

Abbildung 29: Infarktvolumen gesamt

Die Abbildung zeigt die Reduktion des Gesamtinfarktvolumens (mm^3, MW ± SD) durch $MgCl_2$ + Tirilazad, Hypothermie und Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ + Tirilazad + Hypothermie am siebten postoperativen Tag (n = 10 in jeder Gruppe).

* **p < 0,05** versus normothermer Kontrollgruppe.

1.17.5.2 Infarktvolumen in Kortex und Stammganglien

Das kortikale Infarktvolumen der normothermen Kontrolltiere betrug 36,2 ± 12,2 mm^3, bei den normothermen Versuchstieren, die mit der Kombination $MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren 10,8 ± 5,8 mm^3, bei der reinen Hypothermie-Gruppe 1,7 ± 2,2 mm^3 und bei den hypothermen Versuchstieren, die mit der Kombination $MgCl_2$ und Tirilazad behandelt worden waren 0,4 ± 1,3 mm^3. Die deutliche Reduktion des kortikalen Infarktvolumens durch $MgCl_2$ und Tirilazad unter normothermen Bedingungen (–70%) sowie durch Hypothermie allein (-95%) und durch Hypothermie in Kombination mit den beiden Pharmaka (-99%) war, verglichen zur Kontrollgruppe, statistisch signifikant (s. **Abbildung 30**). Die Wirkung der Pharmaka auf die Größe des kortikalen Infarkts war durch zusätzliche Hypothermieanwendung signifikant verbessert.

Bei der Auswertung des Infarktvolumens in den Basalganglien zeigte sich bei den Tieren, die mit den Pharmaka $MgCl_2$ + Tirilazad (19,4 ± 5,4 mm^3) bzw. mit den Pharmaka in Kombination mit Hypothermie (14,9 ± 7,6 mm^3) behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe (32.9 ± 5.3 mm^3) eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens um -41% bzw. –55%. Hypothermiebehandlung alleine konnte das Infarktvolumen in den Basalganglien zwar um 26% reduzieren (24,2 ± 10,4 mm^3), dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Reduktion des Infarktvolumens in den Basalganglien durch die Dreifach-Kombination war nicht nur im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe signifikant, sondern auch im Vergleich zur Hypothermie-Gruppe.

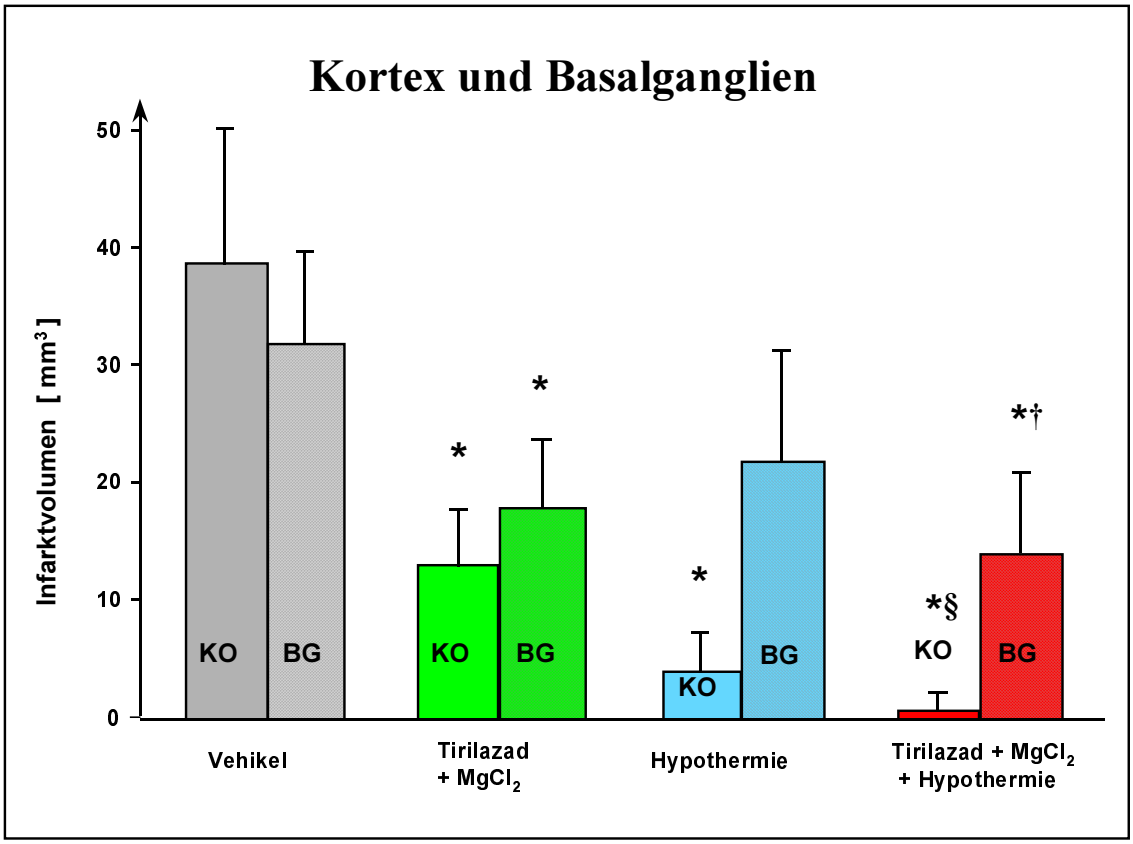

Abbildung 30: Infarktvolumen im Kortex und in den Basalganglien

Reduktion des Infarktvolumens (mm^3, MW ± SD) im Kortex (KO) und in den Basalganglien (BG) durch $MgCl_2$ + Tirilazad, Hypothermie und Kombinationstherapie mit $MgCl_2$ + Tirilazad + Hypothermie.

*** p < 0,05** versus normothermer Kontrollgruppe.

§ p < 0,05 versus $MgCl_2$ + Tirilazad (Normothermie).

† p < 0,05 versus hypothermer Kontrollgruppe.

Diskussion

1.18 Diskussion der Methodik

1.18.1 Physiologische Kontrollparameter

Unter physiologischen Bedingungen bleibt durch die zerebrale Autoregulation die Durchblutung des Gehirns weitgehend konstant. Während einer Halothannarkose sowie unter ischämischen Konditionen ist die Autoregulation jedoch teilweise bzw. ganz aufgehoben,[126] so dass es bereits bei geringen Blutdruckschwankungen zu Auswirkungen auf den zerebralen Blutfluss kommt. Im Tierexperiment wurde gezeigt, dass die Infarktausprägung nach transienter fokaler Ischämie durch induzierte Hypertension vermindert wird.[46] Unter Berücksichtigung der gestörten Autoregulation und des Einflusses des Blutdrucks auf die ischämische Schädigung war im Rahmen unserer Versuche eine kontinuierliche Blutdruckaufzeichnung während der intraoperativen Versuchsphase unerlässlich, um die Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten. In Vorversuchen kam es z.B. während der Infusion von Magnesium in höherer Dosierung zu inakzeptabler arterieller Hypotension mit konsekutivem Perfusionsabfall.

Die regelmäßige Kontrolle der arteriellen Blutgase ist eine weitere notwendige Voraussetzung. Arterielle Hyperkapnie induziert eine Vasodilatation zerebraler Arteriolen und erhöht den Blutfluss durch Verminderung des zerebrovaskulären Widerstands.[251] Eine Änderung des CO_2-Partialdrucks ($PaCO_2$) um 1 mmHg entspricht einer Ab- bzw. Zunahme der Hirndurchblutung um 4%. Die maximale Dilatation der Arteriolen ist bei einem $PaCO_2$ von 80 mmHg erreicht, was einer Erhöhung des zerebralen Blutflusses um ca. 100% entspricht. Hypokapnie mit $PaCO_2$-Werten von 10 - 20 mmHg kann zu zerebraler Ischämie infolge exzessiver Vasokonstriktion führen.[243] Unabhängig von Änderungen des $PaCO_2$ führt Hypoxie bzw. ein verminderter arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) zum Anstieg der zerebralen Perfusion, um die Sauerstoffversorgung des Gehirns aufrechtzuerhalten.[155] Analog dazu resultiert die Erhöhung des PaO_2 in einer Vasokonstriktion von Hirngefäßen.[111] Hypothermie reduziert den Metabolismus des Organismus was einem geringeren O_2-Verbrauch entspricht. Folglich entsteht während hypothermer Konditionen weniger CO_2, was Auswirkungen auf die zerebrale Durchblutung haben kann. Die Blutgase wurden während

unserer Experimente engmaschig kontrolliert und durch Anpassung der Beatmungsparameter im Normbereich gehalten. Lediglich bei den Versuchstieren, die mit Hypothermie behandelt wurden, zeigte sich ein Trend zu niedrigeren $PaCO_2$-Werten und höheren PaO_2-Werten, was statistisch jedoch nicht signifikant war. Dennoch ist hierbei eine geringe Beeinflussung der zerebralen Perfusion nicht auszuschließen. Dieser Sachverhalt wird in der Diskussion der Ergebnisse eingehender behandelt.

Es wurde gezeigt, dass Hämodilution die zerebrale Perfusion sowohl in nicht-ischämischen als auch ischämischen Hirnarealen erhöht.[161] Dieser Effekt kann auf die veränderten rheologischen Fließeigenschaften des Blutes und daraus resultierender verbesserter Mikrozirkulation zurückgeführt werden. Durch Hämodilution während Ischämie scheint somit eine Reduktion des ischämischen Schadens möglich.[232] Bei den Experimenten wurde darauf geachtet, dass stets gleiche Flüssigkeitsvolumina infundiert wurden. Der Blutverlust wurde so gering wie möglich gehalten. Die Auswertung des Verlaufs von Hb und Hämatokrit zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass die Vergleichbarkeit der Versuche diesbezüglich gewährleistet war.

Während Ischämie wird der Energiebedarf der Zelle vorwiegend durch die anaerob ablaufende Glykolyse gedeckt. Als Endprodukt dieses Stoffwechselweges entsteht Milchsäure, welche in minderperfundierten ischämischen Arealen akkumuliert und zu einer Laktatazidose im Gewebe führt.[285] Gewebsazidose gilt als wichtiger pathophysiologischer Faktor, da sie u.a. die Produktion von freien Sauerstoffradikalen fördert. Durch hohe Blutzuckerspiegel wird die Gewebsazidose verstärkt und dadurch der ischämische Schaden vergrößert.[285] Es ist bekannt, dass Magnesium hyperglykämische Stoffwechselsituationen induzieren kann,[30;135] was sich in unseren Versuchen bestätigte. Die gleichzeitige Anwendung von Magnesium und Hypothermie führte sogar zu einem signifikanten Anstieg der Blutglukosewerte, was möglicherweise durch eine Suppression der Insulinausschüttung und vermehrte Glykogenolyse induziert wurde.[300] Die möglichen Folgen dieses Effektes werden bei der Diskussion der Ergebnisse eingehend diskutiert.

Busto und Mitarbeiter beobachteten, dass bereits geringe Temperaturunterschiede im Gehirn von 2–3°C das Ausmaß der ischämischen Schädigung signifikant beeinflussen können.[35] Analog zur neuroprotektiven Wirkung von Hypothermie verschlechtert eine erhöhte Temperatur das Outcome nach ischämischen Ereignissen.[169] In Anbetracht dieser Erkenntnisse wurde im letzten Jahrzehnt die Bedeutung der Temperaturregulation bei experimentellen Studien neu gewichtet. Die exakte Regulation der Körpertemperatur bzw. Hirntemperatur wurde eine unabdingbare Voraussetzung bei der Prüfung zerebroprotektiver

Methoden.[16;204;205] Busto et al. zeigten, dass zwischen der Körpertemperatur und der intrazerebralen Temperatur nur eine mäßige Korrelation besteht. Diese Tatsache lässt eine separate Kontrolle sowie Regulation von Hirn- und Körpertemperatur fordern.[35] Bei unseren Versuchen konnte durch die beiden getrennten Regelkreise eine exakte Regulation der Körper- und v.a. aber auch der Hirntemperatur erreicht werden.

1.18.2 Intraluminales Fadenmodell

Das intraluminale Fadenmodell wurde erstmals 1986 von Koizumi et al.[159] beschrieben. Nachdem es mehrmals u.a. von Zea Longa et al.[338] modifiziert wurde, ist es mittlerweile das meist angewandte Modell der reversiblen fokalen Ischämie zur Untersuchung pathophysiologischer Fragestellungen sowie zur Erprobung von Medikamenten und Strategien hinsichtlich ihres neuroprotektiven Potentials. Mit diesem Modell kann sowohl eine transiente als auch permanente Ischämie induziert werden.[192] Die Vorteile des Modells sind die geringe Invasivität mit geringer perioperativer Mortalität sowie die zeitsparende Operationstechnik. Ferner ist im Vergleich zu anderen Modellen keine Kraniotomie notwendig, die sowohl die Hirnhäute verletzen, den Subarachnoidalraum eröffnen und den intrakraniellen Druck beeinflussen würde. Außerdem müsste bei einer Kraniotomie mit einer Permeabilitätsstörung der Blut-Hirn-Schranke sowie einer Veränderung der Hirntemperatur gerechnet werden.

Die Eigenheiten des Modells bergen aber auch eine Reihe von möglichen Komplikationen, die eine z.T. nur mäßige Reliabilität der Ergebnisse zur Folge haben.[170;220] Bei der intraluminalen Okklusion des Gefäßes durch den Faden, der von extrakraniell vorgeschoben wird, ist es ohne diagnostische Hilfsmittel nicht möglich den adäquaten Verschluss der Arterie zu verifizieren bzw. die inadäquate Okklusion oder eine unbeabsichtigte vorzeitige Reperfusion zu erkennen.[267] Einige Arbeitsgruppen verwenden Techniken wie MRT, EEG oder Laser-Doppler Flowmetrie zur Kontrolle des Gefäßverschlusses.[112;158;196] Viele Gruppen haben jedoch im Versuchsaufbau keinerlei Kontrolle über die MCAO oder SAB. Unsere Arbeitsgruppe hat im Rahmen der Etablierung des Modells die Vor- und Nachteile von EEG und Laser-Doppler Flowmetrie verglichen und die höchste Sensitivität und Spezifität (je 100%) bei der Erkennung einer insuffizienten Okklusion durch kontinuierliche Laser-Doppler Flowmetrie (LDF) nachgewiesen.[267] Im Gegensatz zur vielfach angewandten intermittierend abgeleiteten Laser-Doppler Flowmetrie

kann durch die von uns entwickelte kontinuierliche Messung eine insuffiziente Okklusion, vor allem aber auch eine vorzeitige Reperfusion oder eine Zwischenperfusion erkannt werden.[267] Die häufigste Komplikation des Modells ist die Subarachnoidalblutung (SAB), die durch Perforation durch den Faden entsteht.[22;165] Diese kann mit den herkömmlichen Kontrollmethoden ebenfalls unbemerkt bleiben und die Aussagekraft des Experiments beeinflussen. Durch die von uns entwickelte bilaterale LD-Messung ist eine frühzeitige Diagnose dieser Komplikation gewährleistet. Die Laser-Doppler Flowmetrie ist dem EEG dabei deutlich überlegen.[267] Eine SAB wird mittels dieser Technik sofort erkannt, so dass der Versuch abgebrochen werden kann. Unsere Weiterentwicklung des Okklusionsfadens durch eine Silikonbeschichtung konnte die Häufigkeit der SAB auf ein Minimum senken.[267]

Beschrieben wurde auch eine Thrombosierung der Gefäße im Stromgebiet der A. cerebri media infolge der Strömungsverlangsamung. Viele Autoren empfehlen daher die intraoperative Heparinisierung.[143;196;248] In den Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten keine Thrombosierungen bei den Ratten nachgewiesen werden, wenn die Dauer der Ischämie 90 Minuten betrug. Da jedoch nicht mit absoluter Sicherheit eine Thrombusformation ausgeschlossen werden kann, verwendeten wir ebenfalls Heparin zur Thromboseprophylaxe. Eine weitere Komplikation ist die gelegentlich berichtete Hyperthermie, die sowohl während der Ischämie als auch im Verlauf nach der Ischämie auftreten kann und die Infarktausprägung erheblich beeinflussen kann.[197;342] In unseren Vorversuchen konnte bei Ischämiezeiten bis 90 Minuten keine Hyperthermie nachgewiesen werden.[33;44]

1.18.3 Laser-Doppler Flowmetrie

Die Messung des Laser-Doppler Flux entspricht dem Produkt von Konzentration und mittlerer Geschwindigkeit von bewegten Teilchen, im vorliegenden Fall von überwiegend Erythrozyten.[79] Durch die angewandte Technik der Laser-Doppler Flowmetrie kann somit in einem Gewebevolumen von ca. 1 mm^3 die relative Änderung, nicht jedoch der Absolutwert, der Mikrozirkulation gemessen werden.[82] In einer Reihe von Untersuchungen wurde diese Technik der Messung der Mikrozirkulation mit anderen etablierten Methoden wie der Mikrosphären-Technik[70] oder der Wasserstoff-Clearance-Technik[96] verglichen. Insbesondere am Gehirn konnte eine gute Korrelation der qualitativen Veränderungen der Perfusion, die durch LDF erfasst werden, mit den absoluten Durchblutungswerten anderer Methoden gezeigt

werden.[67] Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Laser-Doppler Flux 400 – 800 Fluxeinheiten. Da die Laser-Doppler Methode nicht selektiv die Bewegung von Blutkörperchen, sondern allgemein bewegte Teilchen misst, fällt beim Ausfall der Perfusion bzw. beim Herzstillstand eines Tieres der gemessene Flux nicht auf Null ab. Der biologische Nullwert bei toten Tieren liegt bei vergleichsweise geringen 5 – 10 Flux-Einheiten und ist somit vernachlässigbar. Es stellt sich vielmehr die Frage, ob die Technik bei Anwendung von Hypothermie weiterhin valide Messwerte liefert. Hinsichtlich der nur geringen Abkühlung der Körpertemperatur auf 33°C kann in Anbetracht des absoluten Temperaturnullpunkts von – 273°C davon ausgegangen werden, dass keine Veränderungen der Messungen auftreten. Ferner arbeitet die Technik mit Licht, dessen physikalisches Verhalten unabhängig von Temperatur ist. Auch die Arbeitsgruppe um Busto und Ginsberg fanden keine Beeinflussung der Messtechnik durch milde Hypothermie.[166]

Ein großer Vorteil der Technik ist die hohe räumliche und zeitliche Auflösung. Dirnagl et al. zeigten, dass bei Neupositionierung der Sonden während eines Experiments die Messergebnisse nicht reproduzierbar sind.[67] Insbesondere die hohe zeitliche Auflösung ist aber von der Reproduzierbarkeit der Messungen abhängig. In unseren Versuchen wurde Wert darauf gelegt, die Sonden zentral im Ischämiegebiet zu platzieren und eine kontinuierliche Messung zu gewährleisten, ohne im Verlauf des Experiments eine Neupositionierung durchzuführen.

Abbildung 8 zeigt den Versuchsaufbau, mit dem die kontinuierliche Laser-Doppler Messung gewährleistet war. Als Problem stellte sich in Voruntersuchungen die hohe Störanfälligkeit z.B. auf Licht heraus. Durch entsprechende Abschirmvorrichtungen konnte dies eliminiert werden. Ein weiterer Nachteil der Technik ist, wie oben erläutert, die nur relative, nicht jedoch absolute Messung der zerebralen Mikrozirkulation. Es wird somit immer die Veränderung der mikrovaskulären Perfusion als Änderung in Prozent des Ausgangswertes des LCBF (lokaler zerebraler Blutfluss) angegeben.

1.18.4 Elektroenzephalographie

Durch Reduktion der zerebralen Perfusion unter einen kritischen Wert von ca. 30-35% der Normaldurchblutung kommt es zur Einschränkung der elektrophysiologischen Aktivität der Neurone. Bei diesen Durchblutungswerten ist die zerebrovaskuläre Reserve unterschritten, so dass sich der neuronale Metabolismus auf den Strukturstoffwechsel reduziert, wohingegen der Funktionsstoffwechsel zum erliegen kommt. In der Elektroenzephalographie stellt sich dies als Abnahme der EEG-Amplitude sowie in der Veränderung der EEG-Muster dar. Ist die Minderdurchblutung nur temporär, kommt es zur Wiederaufnahme der Funktion mit Normalisierung von EEG-Amplitude und -Muster. Bei länger bestehender kritischer Minderperfusion kommt es zum Zelltod und folglich nach Reperfusion nur zu einer teilweisen Erholung der elektrischen Aktivität. Einige Autoren definierten die Wirksamkeit neuroprotektiver Methoden lediglich anhand der Erholung der EEG-Amplitude sowie der EEG-Muster.[309] Vielfach wird das EEG als Zusatzinformation im Sinne der elekrophysiologischen Erholung abgeleitet.[157;199] Die Elektroenzephalographie ist aber auch eine angewandte Methode zur Überwachung der zerebralen Ischämie im Rahmen des experimentellen Setup.[119] In einer Reihe von Voruntersuchungen konnten wir jedoch zeigen, dass die Elektroenzephalographie als Kontrollmessung einige Schwachpunkte aufweist. So kommt es typischerweise erst mit einer Verzögerung von mehreren Minuten zu einem langsamen graduellen Anstieg der EEG-Amplitude nach Beginn der Reperfusion. Vorzeitige Reperfusionen, welche in unseren Versuchen bei bis zu 30 % der Fälle zu verzeichnen waren, werden dadurch nicht rechtzeitig erkannt.[267] Ferner lässt das EEG eine erfolgreiche Reperfusion nicht sicher erkennen, da die Durchblutung nicht direkt, sondern nur die elektrophysiologische Aktivität gemessen wird.

In Studie III wurden die LD-Messung und die EEG-Messung an den identischen Lokalisationen der Gehirnoberfläche vorgenommen, um mögliche Korrelationen zwischen der Perfusion und der elektrophysiologischen Aktivität zu untersuchen. Dazu machten wir uns die hervorragende elektrische Leitfähigkeit der Stahlummantelung der LD-Sonden zu Nutze. Durch Auffüllen der Bohrlöcher mit Leitgel wurde der Kontakt zur Dura mater optimiert, so dass ein artefaktfreies EEG-Signal vom Kortex beider Hemisphären im Sinne eines Elektrokortikogramms abgeleitet werden konnte. Durch die bilaterale unipolare Ableitung mit Referenzelektrode in der Medianlinie im Bereich des Unterkiefers ließen sich somit beide Amplituden des Elektrokortikogramms in Relation zur ipsilateralen Ausgangsamplitude sowie in Relation zur kontralateralen Amplitude setzen.

1.18.5 Quantifizierung der ischämischen Schädigung

Es gibt vermehrt Hinweise, dass die Größe des Infarktareals und die neurologischen Ausfallserscheinungen nicht zwingend korrelieren. Insbesondere Ratten, die mit neuroprotektiven Pharmaka behandelt wurden, können trotz ausgedehntem morphologischen Schaden weniger funktionelle Defizite aufweisen als Kontrolltiere.[93] Schließlich können die am histologischen Schnitt erkennbaren morphologischen Veränderungen keinerlei Aussage über den physiologischen Funktionszustand des einzelnen Neurons bzw. über die interneuronale Vernetzung geben. Darüber hinaus hat die histomorphometrische Auswertung nur Aussagekraft über das Infarktvolumen am Tag der Gehirnentnahme, während eine Verlaufskontrolle nicht möglich ist.

Morphologische Quantifizierung, insbesondere wenn sie sehr früh nach einer Ischämie durchgeführt wird, reflektiert nicht das wahre Ausmaß der Schädigung.[53;326] Aus diesem Grunde wurden in unseren Versuchen die Tiere erst sieben Tage nach Ischämie geopfert und das Gehirn histologisch untersucht. In Anbetracht des Wissens um die sekundäre Zellschädigung sind sowohl frühexperimentelle Funktionsbestimmungen, als auch Verlaufsbeobachtungen wünschenswert.[326] Der morphologische Schaden sollte nicht der einzige Maßstab für neuroprotektive Therapien sein.[53;128] Der alleinige Einsatz von histomorphometrischen Verfahren zur Beurteilung der Wirksamkeit von potentiellen neuroprotektiven Therapien erscheint auch insofern fraglich, als der für einen betroffen Patienten bedeutendste Faktor das Ausmaß der neurologischen Defizite und nicht die Infarktgröße ist.

In unseren Versuchen wurde zur Beurteilung der verschiedenen protektiven Verfahren, zusätzlich zur histologischen Auswertung des Infarktareals, die tägliche Bestimmung der neurologischen Defizite durchgeführt. Dies gewährleistete einerseits eine frühexperimentelle Beurteilung der Therapien und andererseits eine Verlaufsbeobachtung. In Studie III wurde ferner das EEG intraoperativ aufgezeichnet, was zusätzliche Informationen über die frühexperimentelle Erholung der elektrophysiologischen Aktivität einbrachte.

Für eine exakte Bestimmung des Infarktvolumens wird ein Minimum von acht repräsentativen Schnitten gefordert.[234] Im Rahmen unserer Auswertungen wurden 24 HE-gefärbte Schnitte in definiertem Abstand ausgewertet, so dass eine exakte Annäherung an das

tatsächliche Infarktvolumen gewährleistet ist. In einigen Publikationen wird eine Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre berichtet, die vor allem innerhalb der ersten 3-4 Tage existent war. In unseren Versuchen wurden die Hirne am 7. postoperativen Tag entnommen. Die Volumina der ipsi- und kontralateralen Hemisphären waren identisch, so dass eine Korrektur aufgrund der ipsilateralen Schwellungsreaktion nicht erforderlich war.[14;179]

1.19 Diskussion der Ergebnisse

1.19.1 Studie I: Dextromethorphan und Tirilazad

Die erste Studie im Rahmen unseres Vorhabens zeigte, dass beide Pharmaka, wie mehrfach in der Literatur beschrieben, als Monotherapeutika eindeutig zerebroprotektives Potential besitzen. Trotz der unterschiedlichen Wirkmechanismen, die nach unserer Hypothese in kombinierter Anwendung eine Steigerung der Wirksamkeit erwarten ließen, hoben sich die beiden Medikamente in Kombination in ihrer Wirksamkeit auf.[268]

Die Monotherapie mit Dextromethorphan bzw. Tirilazad reduzierte das Infarktvolumen um 45% bzw. 48%. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen war die protektive Wirkung auf den Kortex stärker ausgeprägt als auf die Basalganglien, was die These stützt, dass Tirilazad und Glutamatantagonisten ihre Wirkung am besten in der Penumbra, in der Zone mit Rest- bzw. Kollateralblutfluss, entfalten.[285;331]

Ein möglicher Wirkmechanismus von Dextromethorphan ist die Verbesserung der postischämischen Perfusion des ischämischen Areals. Steinberg et al. konnten diesen Effekt am Kaninchen zeigen.[182;304] Es ist jedoch nicht geklärt, ob die Verbesserung der Durchblutung durch die Interaktion mit den spannungsabhängigen Kalziumkanälen der zerebralen Gefäße bedingt ist,[302;318] oder ob es sich dabei bereits um eine Folge der Neuroprotektion handelt. In der Literatur werden für Dextromethorphan sehr unterschiedliche Ausmaße der Reduktionen der Infarktvolumina zwischen 24% und 92% angegeben.[32;68;303;306] Unsere Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse von Steinberg und Mitarbeiter. Sowohl in der Dextromethorphan-Monotherapiegruppe, als auch in der Kombinationsgruppe war die postischämische Hypoperfusion signifikant geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Allerdings scheint die Verbesserung der unmittelbar postischämischen Durchblutung nicht der entscheidende protektive Faktor zu sein, da die Kombinationstherapie bei keinem der erhobenen Outcome-

Parametern eine eindeutige Wirkung zeigte. Diese Ergebnisse erhärten somit die These, dass andere Mechanismen, wie die Hemmung der Glutamatfreisetzung[7;47] oder die direkte Interaktion mit dem NMDA-Rezeptorkomplex,[47;76;317] zur protektiven Potenz Dextromethorphans beitragen. Auch antikonvulsive Eigenschaften von Dextromethorphan und die damit verbundene Senkung der neuronalen Aktivität, z.B. durch Unterdrückung von sog. „spreading depressions“ könnten im Vordergrund der Wirkung stehen.[272;316;320]

Im Gegensatz zu Dextromethorphan bewirkte Tirilazad in unseren Versuchen keine Verbesserung der postischämischen Perfusion. Dieses Ergebnis war in unseren Arbeiten mit 21-Aminosteroiden reproduzierbar[270] und ist konsistent mit Studien von Xue et al.[331] sowie Müller und Mitarbeiter.[218] Mit verschiedenen Techniken wie Laser-Doppler Flowmetrie bzw. perfusions- und diffusionsgewichteter Kernspintomographie konnte in diesen Studien keine Beeinflussung der postischämischen Hypoperfusion nachgewiesen werden. Müller et al. fanden lediglich intraischämisch eine Verbesserung der Mikrozirkulation bzw. eine Zunahme der Kollateraldurchblutung im ischämischen Areal. Auch die mit Tirilazad erzielte Reduktion des Infarktvolumens von 48% scheint in Übereinstimmung mit Ergebnissen dieser Arbeitsgruppen, ebenfalls in der Größenordnung von 40%, zu sein.[218;331] In einer Studie an einer dem Menschen näherstehenden Spezies, den Menschenaffen, konnten Mori et al. durch Tirilazad nach Verschluss der A. cerebri media eine Reduktion des Infarktvolumens um 40% sowie geringere neurologische Defizite nachweisen.[209]

Tirilazad ist ein Sauerstoffradikalfänger bzw. Inhibitor der durch Radikale induzierten Lipidperoxidation. An verschiedenen artifiziellen Membransystemen, aber auch an vitalen Zellen, konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt vor allem durch die Bindung von Peroxylradikalen sowie von Hydroxylradikalen erzeugt wird.[195;327] Ferner wird die Kettenreaktion der Lipidperoxidation durch eine Verringerung der Membranfluidität bzw. durch Membranstabilisierung gehemmt. Man nimmt an, dieser Effekt entsteht durch die Charakteristik der 21-Aminosteroide, sich innerhalb der Lipiddoppelschicht der Membran einzulagern.[120] Dabei ordnet sich das Sterangerüst innerhalb der hydrophoben Membranmitte ein, der positiv geladene Teil des Moleküls lagert sich im Bereich der Membranoberfläche an.[104] Infolge der Hemmung der Lipidperoxidation kommt es auch zu einer geringeren Freisetzung von Arachidonsäure sowie deren Metabolite. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften Tirilazads, mit hoher Affinität zum Gefäßendothel,[101;104] ist zwar an diesen Strukturen mit der antioxidativen neuroprotektiven Wirkung zu rechnen,[100] ein Einfluss auf

die postischämische Perfusion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich in mehreren Studien signifikant weniger postischämisches zerebrales Ödem.[31;100;149] Weitere potentiell protektive Mechanismen von Tirilazad könnten positive Einflüsse auf die Ionenhomöostase, den intrazellulären pH sowie auf die ATP-Bildung bzw. den ATP-Verbrauch darstellen.[106;110]

Eine additive neuroprotektive Wirkung konnte mit der Kombination Dextromethorphan und Tirilazad nicht erzielt werden. Im Gegenteil, die Kombination war weniger wirksam, als die Monotherapien. Es stellt sich die Frage, warum es zu diesem durchaus überraschenden Ergebnis kommt. Es bieten sich mehrere Ansatzpunkte, die im folgenden erörtert werden: (1) Die Kombination von Glutamat-Antagonisten und Sauerstoff-radikalfänger ist generell nicht wirksam, (2) die Nebenwirkungen der Einzelsubstanzen haben sich addiert bzw. potenziert, (3) die Kombination der Wirkstoffe führt zur Beeinflussung der jeweiligen Pharmakokinetik.

Es liegen bisher nur wenige Studien vor, die einen kombinierten Therapieansatz von Glutamat-Antagonisten und Radikalfängern behandelt haben. In einem in vitro Modell konnten Barth et al. durch MK-801 und PBN sowohl eine Wirkungssteigerung, als auch eine Verlängerung des therapeutischen Fensters nachweisen.[21] Auer et al. zeigten am Modell der globalen Ischämie mit einer Kombination aus MK-801, Tirilazad, Insulin und Diazepam eine Reduktion des Zellschadens im Kortex.[237] Auch Magnesium besitzt eine Wirkkomponente am Glutamatrezeptor. In Studie II dieser Arbeit konnte die Kombination Magnesium und Tirilazad eine verbesserte Wirksamkeit vorweisen. Die Kombination aus Glutamat-antagonisten und Sauerstoffradikalfänger erscheint somit weiterhin vielversprechend. Die Erklärung für die Wirkungslosigkeit der Kombination aus Dextromethorphan und Tirilazad ist somit wahrscheinlich in anderen Bereichen zu suchen.[163;339;340]

Mögliche Nebenwirkungen von Tirilazad sind Lungenödem, Sepsis und Tachykardie. In großen klinischen Studien konnte jedoch keine Beeinträchtigung der Nieren-, Leber-, Herz- oder Lungenfunktion nachgewiesen werden.[98;99;151;276] Es traten lediglich in manchen Fällen Reizungen der Injektionsstellen sowie Phlebitiden auf. Dextromethorphan ist aufgrund sehr guter Verträglichkeit als Antitussivum rezeptfrei erhältlich.[26] Allerdings traten, in höheren Dosierungen verabreicht, Halluzinationen und Müdigkeit sowie arterielle Hypotonie, Atemdepression und Stupor auf.[3] Insbesondere bei Patienten mit zerebralen Insulten scheinen

diese Nebenwirkungen von NMDA-Antagonisten verstärkt aufzutreten. Dieses Phänomen konnte auch im Tiermodell an der Ratte reproduziert werden.[185] In unseren Versuchen wurden deshalb die physiologischen Parameter engmaschig überwacht. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Es kann dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass in der Gruppe, die mit der Kombinationstherapie behandelt worden war, eine verzögerte zentralnervöse oder kardiorespiratorisch depressive Nebenwirkung aufgetreten ist.[77;259;260] Nachdem beide Pharmaka über die Leber metabolisiert werden und die Ausfällung von Tirilazad beschrieben ist,[54;74;75;206;327] fertigten wir histologische Schnitte von Leber und Nieren der Tiere an. Es fand sich aber kein Hinweis auf Nephro- oder Hepatotoxizität.

Ebenso wie Interaktionen im Rahmen der Plasmaproteinbindung nicht auszuschließen sind, besteht die Möglichkeit von Interferenzen im Metabolismus beider Pharmaka mit Auswirkungen auf Pharmakodynamik und -kinetik. Dextromethorphan wird beispielsweise zu seinem aktiven Metaboliten Dextrorphan abgebaut. Dieser Stoffwechselweg kann durch andere Pharmaka beeinflusst werden.[4;330] Nicht nur für Dextromethorphan, sondern auch für Tirilazad wurden Interaktionen mit anderen Pharmaka beschrieben,[73;291;295] so dass es vorstellbar ist, dass beide Pharmaka sich in ihrer protektiven Wirkung gegenseitig hemmen oder ihre potentiell schädlichen Nebenwirkungen verstärken. Denkbar wäre auch, dass durch Verdrängung von Dextromethorphan aus der Plasmaproteinbindung durch Tirilazad höhere Plasmakonzentrationen des NMDA-Antagonisten erreicht wurden.

1.19.2 Studie II: Magnesium und Tirilazad

In Studie II unseres Vorhabens bestätigte sich erneut, dass die verwendeten Medikamente als Monotherapeutika neuroprotektive Potenz besitzen. Im Gegensatz zu Studie I konnte durch diese Versuche die Hypothese bekräftigt werden, dass eine kombinierte Anwendung eines Kalzium- bzw. NMDA-Antagonisten und eines Sauerstoffradikalfängers den Einzeltherapien überlegen ist.[269] In sämtlichen erhobenen "Outcome-Parametern" zeigten die Tiere, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, das beste Ergebnis. Die Einzeltherapie mit Tirilazad bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche in Studie I und erreichte eine vergleichbare Reduktion des Infarktvolumens. Die Protektion war ebenfalls im Kortex stärker ausgeprägt als in den Basalganglien. Die potentiellen Wirkmechanismen von Tirilazad wurden bereits im vorangehenden Kapitel diskutiert.

Die Einzeltherapie mit $MgCl_2$ reduzierte das Gesamtinfarktvolumen um 25 %, den Infarkt in den Basalganglien um 13 % und den kortikalen Infarkt signifikant um 37 %. Somit zeigt sich auch bei Magnesium eine überlegene Protektion im Kortex. Die Ergebnisse sind vereinbar mit einer Studie von Izumi und Mitarbeitern,[135] in der durch $MgCl_2$ eine Reduktion des Gesamtinfarktvolumens um statistisch signifikante 26 % erreicht wurde. Es sind nur wenige Arbeiten in der Literatur vorhanden, die mit unserer Arbeit vergleichbar sind. So kommen häufig unterschiedliche Magnesiumsalze zum Einsatz. Es ist aber unbekannt, ob die verschiedenen Salze (z.B. $MgCl_2$, $MgSO_4$) unterschiedliche neuroprotektive Wirkung besitzen.[19;114;129;130;212;226] Ferner wird von einigen Autoren die intraarterielle Applikation von Magnesiumsalzen angewandt und favorisiert. In einer Studie mit intraarterieller Verabreichung von $MgSO_4$ wurde dosisabhängig bis zu 57 % Reduktion des Infarktareals bei fokaler Ischämie an der Ratte beschrieben.[189] Hierzu ist anzumerken, dass im Rahmen dieser Studie die Infarktvolumina bereits nach 24 Stunden ausgewertet wurden, also bevor die Infarktbildung abgeschlossen war.[326] Es gibt Hinweise, dass die neuroprotektive Wirkung von Magnesium von der extrazellulären Magnesiumkonzentration im ischämischen Areal abhängt.[30;44;71;150;321] Intraarteriell verabreichte hohe Dosen von 90 mg/kg $MgSO_4$ können in der Tat für die ausgeprägte neuroprotektive Wirkung verantwortlich sein. Der genaue Zusammenhang zwischen intraarterieller Verabreichung von Magnesium und der extrazellulären Magnesiumkonzentration wurde jedoch nicht weiter untersucht.[189] Hingegen ist bekannt, dass Magnesium bei intravenöser Verabreichung die intakte Blut-Hirn-Schranke überwindet.[81;314] Die Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Liquor bei Katzen führt zu einer dosisabhängigen Dilatation pialer Arterien.[277] Eine andere Arbeit wies nach, dass $MgSO_4$ die Durchblutung im ischämischen Kortex während der Okklusion der A. cerebri media bei Ratten verbessert.[44] Einen potentiellen Wirkmechanismus stellt somit die Vasodilatation dar,[5;25] die wahrscheinlich durch einen verminderten Einstrom von Kalziumionen in die glatten Gefäßmuskelzellen bedingt ist.[277]

In unserer Arbeit ließ sich weder durch Magnesium, noch durch Tirilazad ein Einfluss auf den zerebralen Blutfluss nachweisen. Möglicherweise liegt der fehlende Nachweis einer vaskulären Reaktion daran, dass unsere Messung mittels Laser-Doppler Flowmetrie sehr nahe am ischämischen Zentrum vorgenommen wurde, wo bereits eine maximale Dilatation der Blutgefässe bestand.[146;219] Eine Beeinflussung der Perfusion in großen Teilen der Penumbrazone sowie der weiteren Randgebiete des Ischämieareals konnte durch unsere

Messanordnung nicht erfasst werden. Es scheint unwahrscheinlich, dass das Magnesiumsalz ($MgCl_2$) an der fehlenden Beeinflussung der Perfusion ursächlich beteiligt ist. $MgCl_2$ hat im Vergleich zu $MgSO_4$, Mg-Aspartat-HCl und Mg-Acetat die ausgeprägteste vasodilatative Wirkung.[226] In Voruntersuchungen manifestierte sich bei einigen Tieren nach höheren Dosen von Magnesium eine ausgeprägte arterielle Hypotension, die bei der letztlich verwendeten Dosis von 2 x 1 mmol/kg Körpergewicht nicht bzw. nur in geringem Maße zu beobachten war. Es ist somit denkbar, dass die von uns verwendete Dosierung und die dadurch erreichbare Plasmakonzentration sich in einem nicht vasodilatativ wirksamen Bereich befand.

Hyperglykämie und eben auch arterielle Hypotension sind Faktoren, die in experimentellen Studien die Schädigung nach zerebraler Ischämie steigerten.[13;58;188;286;343] In klinischen Versuchen mit Magnesium waren Hyperglykämie und Hypotension nicht beobachtet worden,[215] wohl aber bei Ratten.[56;134] In unseren Studien zeigte sich ein Trend zu höheren Glukosespiegeln nach Magnesiumverabreichung. Ebenso kam es während der Infusion von Magnesium zu einem transienten Blutdruckabfall. Beide Effekte waren zwar nicht signifikant, es lassen sich aber Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Therapie nicht gänzlich ausschließen. Gerade im Grenzbereich zwischen permanenter, irreparabler Zellschädigung und reversibler Zellschädigung ist es denkbar, dass nur geringste Abweichungen einen messbaren Effekt erzielen. In unserer Arbeit würde ein solcher Effekt somit das Ergebnis der $MgCl_2$-Monotherapie als auch der Kombinationstherapie schmälern.

Nachdem keine Auswirkung auf den zerebralen Blutfluss festzustellen war, ist es wahrscheinlich, dass der protektive Effekt von Magnesium, zumindest in unserem Modell der fokalen Ischämie, durch seine Eigenschaften als Kalzium- und Glutamatantagonist bedingt ist.[85;125;133;228;258] Die kombinierte Anwendung dieses NMDA-Antagonisten zusammen mit dem Sauerstoffradikalfänger Tirilazad führte zu einer zusätzlichen Reduktion des Infarktvolumens im Kortex um insgesamt 72 %. Auch hier bestätigt sich die Beobachtung, dass beide Stoffklassen vor allem im Kortex bzw. in der Penumbrazone hohe Wirksamkeit besitzen. Ferner wiesen die Tiere, die mit der Kombination behandelt wurden eine deutlich bessere neurologische Erholung auf, die im Gegensatz zu den Monotherapien bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 7 Tagen Bestand hatte. Außerdem zeigten diese Tiere die beste Gewichtsentwicklung, was auf einen sehr guten Allgemeinzustand deutet. Die Summation dieser Outcome-Parameter lässt auf eine insgesamt bessere Neuroprotektion durch die Kombinationstherapie schließen.[9;24;255]

Im Gegensatz zu Studie I konnte die Kombination eines Kalzium- und Glutamatantagonisten mit einem Sauerstoffradikalfänger in Studie II die Hypothese einer additiven Neuroprotektion bekräftigen. Bisher wurden, wie bereits erwähnt, keine Kombinationen von antioxidativen und antiexzitatorischen Pharmaka an Modellen der fokalen Ischämie des Gehirns getestet. Die meisten Untersuchungen wurden an Modellen der Hypoxie oder globalen Ischämie durchgeführt. Eine Vergleichbarkeit mit unseren Ergebnissen ist somit nur bedingt gewährleistet. Dennoch scheinen die Ergebnisse dieser Studien im Wesentlichen in Einklang mit unseren Ergebnissen zu stehen. Bei Hunden, die mit dem NMDA-Antagonisten GPI und dem Antioxidans Desferoxamin behandelt wurden, erholte sich nach inkompletter globaler Ischämie das Kreatinphosphat in höherem Maße, als mit der jeweiligen Monotherapie.[57] Thordstein et al. untersuchte eine Kombination von L-Methionin (Antioxidans), Mannitol und $MgSO_4$ an einem Modell des perinatalen hypoxischen Hirnschadens. Die Autoren vermuteten, dass die Kombination von Pharmaka mit verschiedenen Mechanismen wirksamer ist, als eine Monotherapie.[313] Die Pharmaka wurden jedoch nicht einzeln getestet. Auer zeigte, dass mit MK-801 und Tirilazad behandelte Ratten einen geringeren Schaden im Neokortex nach globaler Ischämie aufwiesen, als nur mit Tirilazad behandelte Ratten.[12]

1.19.3 Studie III: Magnesium, Tirilazad und Hypothermie

Nachdem sich in Studie II die Kombination mit Magnesium und Tirilazad als eine vielversprechende Pharmakotherapie herausstellte, konnten wir in dieser Versuchsreihe einerseits das protektive Potential der angewandten Hypothermie bestätigen und andererseits zeigen, dass selbst die effektivste Monotherapie - Hypothermie - in ihrer Wirkung durch zusätzliche pharmakologische Protektion gesteigert werden kann.[262] Die Kombinationstherapie resultierte als einzige Therapie in einer signifikanten Verbesserung der elektro-physiologischen Erholung. Die Tiere hatten ferner vom ersten postoperativen Tag an signifikant weniger neurologische Defizite, zeigten die beste Gewichtsentwicklung und hatten in der histologischen Auswertung das geringste Infarktvolumen.

Das Gesamtinfarktvolumen wurde durch die kombinierte Pharmakotherapie mit Magnesium und Tirilazad, vergleichbar mit Studie II, um 56% reduziert. Der Effekt war, wie in der vorangegangenen Versuchsreihe, im Kortex (-70%) stärker ausgeprägt als in den

Basalganglien (-41%). Hypothermie reduzierte das Gesamtinfarktvolumen um 63% und war somit die wirkungsvollste Monotherapie. Interessanterweise wurde vorwiegend eine Infarzierung des Kortex verhindert (-95%), während die Reduktion des Infarktvolumens in den Basalganglien (-26%) deutlich geringer ausgeprägt und nicht signifikant war. Unter der Dreifach-Kombination konnte die Bildung des kortikalen Infarkts nahezu vollständig verhindert (-99%), das Infarktareal in den Basalganglien deutlich reduziert (-55%) und das Gesamtinfarktvolumen um insgesamt 77% gesenkt werden. Die Kombination zeigte bereits in frühexperimentellen Parametern ihre Überlegenheit. So erholte sich innerhalb der ersten beiden postischämischen Stunden die elektrische Aktivität über der betroffenen Hemisphäre auf 89% des Ausgangswertes. Ferner wies diese Gruppe bereits am ersten Tag signifikant geringere neurologische Defizite auf. Am siebten Tag hatte keines der Tiere residuale neurologische Ausfälle. In der Literatur finden sich kaum vergleichbare Arbeiten. Vacanti und Ames fanden am Kaninchen, dass Tiere die mit Hypothermie (34°C) oder $MgCl_2$ behandelt wurden, spinale Ischämie doppelt solange wie Kontrolltiere tolerierten. Die Kombination von Hypothermie und $MgCl_2$ konnte die Toleranzspanne sogar verdreifachen.[325] Nach globaler Ischämie bei Ratten hatte weder Hypothermie noch Verabreichung von MK-801 eine Wirkung auf das Überleben von Nervenzellen im Hippocampus.[66] Wenn jedoch beide Therapien kombiniert wurden, stieg die Anzahl der überlebenden Zellen auf das siebenfache und die Versuchstiere zeigten wie in unserer Studie weniger neurologische Ausfälle.[94] Hingegen konnte durch den NMDA-Antagonisten CGS 19755 nach globaler Ischämie am Gerbil weder in Monotherapie noch mit der Kombination mit Hypothermie ein anhaltender protektiver Effekt erzielt werden.[283] Bei fokaler Ischämie verminderte sowohl Hypothermie, als auch MK-801 das Infarktvolumen. Eine Kombination beider Verfahren erbrachte allerdings keinen zusätzlichen Schutz.[78]

Die möglichen Wirkmechanismen von Magnesium und Tirilazad wurden in den vorangehenden Kapiteln bereits diskutiert. Rosomoff und Holaday[257] beschrieben bereits vor knapp 50 Jahren den Einfluss von Hypothermie auf die zerebrale Durchblutung. Sie konnten zeigen, dass durch die Herabsetzung der Körpertemperatur der Blutfluss sukzessive abnimmt. Diese Tatsache konnte bei verschiedenen Spezies reproduziert werden.[113;183;202] In einer von Steen und Mitarbeitern durchgeführten Versuchsreihe[299] kam es zu einer Abnahme der zerebralen Durchblutung des Affen auf 60-70 % des Ausgangswertes, nachdem die Temperatur auf 29°C gesenkt wurde. In unseren Experimenten bewirkte die milde Hypothermie von 33°C eine Abnahme auf ca. 80% des Ausgangswertes bei 37°C. Ebenso

erreichte der Blutfluss nach Wiedererwärmung den Ausgangswert. Während der Ischämie hatte Hypothermie keinen Einfluss auf die Durchblutung. Es kam jedoch zu einer kurzfristigen Verlängerung der initialen Hyperämie nach Reperfusion. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Verabreichung von $MgCl_2$ + Tirilazad verstärkt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beschrieben Baldwin und Mitarbeiter[17] sowie die Arbeitsgruppe um Oku,[233] dass Hypothermie bei Hunden die frühe postischämische Hyperämie nach Herzstillstand verstärkt, ohne die postischämische Minderdurchblutung zu beeinflussen. Andere Autoren beschrieben eine abgeschwächte Hyperämie,[146] höheren intra- und postischämischen Blutfluss[124;138;147] oder konnten keinerlei Einfluss von Hypothermie auf den CBF nachweisen.[36;210] Die Ergebnisse sind offensichtlich sehr unterschiedlich. Als Grund für die initiale Hyperperfusion, die bei unseren Hypothermiegruppen auftrat, könnten Veränderungen der Elektrolyt- bzw. Ionenhomöostase in Frage kommen.[11;28] So wurde bereits 1953 unter hypothermen Versuchsbedingungen eine Erhöhung des Serumspiegels von Magnesium aufgezeigt.[242] Nachdem Magnesium vasodilatativ wirkt, wäre dieser Hyperperfusionseffekt erklärt.[277] In Zusammenschau der unterschiedlichen experimentellen Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen der Hypothermie auf den zerebralen Blutfluss erscheint es wahrscheinlich, dass die zerebrovaskuläre Reaktion und die lokale hämodynamische Konsequenz vom Grad der Hypothermie oder der Spezies abhängt.[64;275] Es wurden auch nach selektiver Kühlung des Gehirns und nach Ganzkörperkühlung unterschiedliche Ergebnisse berichtet.[183;166]

In Studie III beobachteten wir, wie in Studie II, einen nicht signifikanten Anstieg der Glucosewerte bei den mit Magnesium behandelten Tieren. Dieser Anstieg war auch in den Hypothermiegruppen erkennbar. In der Kombinationsgruppe $MgCl_2$ + Tirilazad + Hypothermie addierte sich diese Wirkung zu einem signifikanten Anstieg der Blutglukose während des Experiments. Dies ist bei beiden Therapien bekannt. Der Effekt von Magnesium wurde bereits diskutiert. Der Glukoseanstieg in den Hypothermiegruppen ist wahrscheinlich durch eine Suppression der Insulinausschüttung und vermehrte Glykogenolyse bedingt.[273;300]

Hypothermie gilt als eine der effektivsten neuroprotektiven Maßnahmen bei tierexperimenteller zerebraler Ischämie.[20;50] Eine Reihe verschiedenartiger Wirkmechanismen wurden diskutiert.[64;89] Hypothermie greift protektiv in mehrere Vorgänge innerhalb der sog. ischämischen Kaskade wie z.B. Sauerstoffradikalbildung, Glutamatfreisetzung oder Lipidperoxidation ein. Die verschiedenen Wirkungsmechanismen sind möglicherweise für den überzeugenden protektiven Effekt verantwortlich. Es wurde die Hemmung der Glutamatfreisetzung[52;123] sowie eine Verbesserung der Wiederaufnahme von Glutamat nachgewiesen.[341] Zusätzlich greift Hypothermie in die Arachidonsäure-Kaskade ein, hemmt die Bildung freier Radikale und verhindert die Lipidperoxidation.[61;175;176] Hinzu kommt die Reduktion des zerebralen Metabolismus,[55;80;162;171] eine Verringerung des postischämischen Ödems und damit eine Verminderung des intrakraniellen Drucks.[17;61]

Hypothermie führt darüber hinaus zur Stabilisierung der Zellmembranen und somit zu einer ausgeglicheneren Ionen-Homöostase.[154] Ein weiterer entscheidender Schritt in der Zellschädigung ist die Aktivierung der Proteinkinase C und von Lipasen sowie letztendlich die Fragmentierung der DNA. Auch hier greift Hypothermie ein.[38;164;227;315] Weitere protektive Mechanismen sind die Hemmung der NO-Synthese[168;307] oder die Verminderung der Gewebsazidose.[122] Neuerdings gibt es vermehrt Hinweise, dass Hypothermie die Proteinsynthese und Expression protektiv wirksamer Gene unterstützt.[144;145;167]

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, hinsichtlich der Problematik eines temporären Gefäßverschlusses, einen kombinierten therapeutischen Ansatz zur Vermeidung ischämischer Schädigungen und damit von irreversiblen neurologischen Ausfällen zu entwickeln und dessen Wirksamkeit im Tierexperiment an Ratten zu überprüfen.

Die vorliegende Arbeit behandelt drei Versuchsreihen, die das pathophysiologisch orientierte Konzept einer kombinierten bzw. multimodalen Behandlungsstrategie bei transienter fokaler zerebraler Ischämie untersuchen. Die Überlegung war, dass durch gleichzeitigen Antagonismus sowohl von freien Radikalen, als auch von exzitotoxischen Aminosäuren und Kalzium eine gesteigerte neuroprotektive Wirkung erzielt werden kann. Diese Hypothese konnte allerdings durch die Studie I nicht gestützt werden. Eine Kombination von Dextromethorphan und Tirilazad erscheint zumindest in der gewählten Dosierung wenig erfolgversprechend. Im Gegensatz dazu konnte in Studie II durch Magnesium und Tirilazad eine überzeugende Neuroprotektion in einem für neurochirurgische Fragestellungen relevanten Modell erzielt werden.

In der dritten Versuchsreihe zeigte sich schließlich anhand elektrophysiologischer, funktioneller und morphologischer Parameter, dass die kombinierte Pharmakotherapie mit Magnesium und Tirilazad die Wirksamkeit der bisher als effektivste Therapie angesehenen Hypothermie steigern kann. Milde Hypothermie ist perioperativ leicht zu erzeugen und weitgehend nebenwirkungsfrei. Sie scheint jedoch die schädliche Wirkung von freien Radikalen bzw. von Kalzium und Glutamat nicht optimal zu antagonisieren. Die Kombination von Hypothermie und dem pharmakologischen Antagonismus von freien Radikalen sowie von Kalzium bzw. Glutamat scheint offensichtlich hohes zerebroprotektives Potential bei fokaler Ischämie zu besitzen. Von großem Vorteil für die vorliegende Dreifach-Therapie ist die Tatsache, dass jede Einzelkomponente bereits für den klinischen Einsatz am Patienten zugelassen ist.

Zwischenzeitlich wurde von der Ethikkomission der Ludwig-Maximilians-Universität eine prospektiv, randomisierte klinische Studie mit dieser neu entwickelten Kombinations-therapie genehmigt. Die Neurochirurgische Klinik des Klinikum Großhadern führt diese Studie derzeit an Patienten mit zerebralen Aneurysmen durch.

Literaturverzeichnis

1. Adachi N, Chen J, Liu K, Tsubota S, Arai T. Dexamethasone aggravates ischemia-induced neuronal damage by facilitating the onset of anoxic depolarization and the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in gerbil hippocampus. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1998;18:274-80.

2. Albers GW. Potential therapeutic uses of N-methyl-D-aspartate antagonists in cerebral ischemia. Clin.Neuropharmacol. 1990;13:177-97.

3. Albers GW, Atkinson RP, Kelley RE, Rosenbaum DM. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl- D- aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. Stroke 1995;26:254-58.

4. Albers GW, Saenz RE, Moses JAJ, Choi DW. Safety and tolerance of oral dextromethorphan in patients at risk for brain ischemia. Stroke 1991;22:1075-77.

5. Altura BT, Altura BM. Interactions of Mg and K on cerebral vessels - aspects in view of stroke. Review of present status and new findings. Magnesium 1984;3:195-211.

6. Amagasa M, Mizoi K, Ogawa A, Yoshimoto T. Actions of brain-protecting substances against both oxygen and glucose deprivation in the guinea pig hippocampal neurons studied in vitro. Brain Res. 1989;504:87-93.

7. Annels SJ, Ellis Y, Davies JA. Non-opioid antitussives inhibit endogenous glutamate release from rabbit hippocampal slices. Brain Res. 1991;564:341-43.

8. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Treatment of experimental focal ischemia in rats with lubeluzole. Neuropharmacology 1996;35:689-93.

9. Aspey BS, Alp MS, Patel Y, Harrison MJ. Effects of combined glutamate and platelet-activating factor inhibition on the outcome of focal cerebral ischaemia - an initial screening study. Metab.Brain Dis. 1997;12:237-49.

10. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Threshholds in cerebral ischemia - The ischemic penumbra. Stroke 1981;12:723-25.

11. Astrup J, Skovsted P, Gjerris F, Sorensen HR. Increase in extracellular potassium in the brain during circulatory arrest: effects of hypothermia, lidocaine, and thiopental. Anesthesiology 1981;55:256-62.

12. Auer RN. Combination therapy with U74006F (tirilazad mesylate), MK- 801, insulin and diazepam in transient forebrain ischaemia. Neurol.Res. 1995;17:132-36.

13. Auer RN. Insulin, blood glucose levels, and ischemic brain damage. Neurology 1998;51:S39-S43.

14. Avendano C, Roda JM, Carceller F, Dieztejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: A stereological evaluation. Brain Res. 1995;673:83-92.

15. Baker CJ, Fiore AJ, Frazzini VI, Choudhri TF, Zubay GP, Solomon RA. Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the cores of permanent focal cerebral infarcts. Neurosurgery 1995;36:994-1001.

16. Baker CJ, Onesti ST, Barth KN, Prestigiacomo CJ, Solomon RA. Hypothermic protection following middle cerebral artery occlusion in the rat. Surg.Neurol. 1991;36:175-80.

17. Baldwin WA, Kirsch JR, Hurn PD, Toung WS, Traystman RJ. Hypothermic cerebral reperfusion and recovery from ischemia. Am.J.Physiol. 1991;261:H774-H781.

18. Bane A, Rojas D, Indermaur K, Bennett T, Avery D. Adverse effects of dextromethorphan on the spatial learning of rats in the morris water maze. Eur.J.Pharmacol. 1996;302:7-12.

19. Bara M, Guiet-Bara A, Durlach J. Comparative effects of $MgCl_2$ and $MgSO_4$ on the ionic transfer components through the isolated human amniotic membrane. Magnes.Res. 1994;7:11-16.

20. Barone FC, Feuerstein GZ, White RF. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. Neurosci.Biobehav.Rev. 1997;21:31-44.

21. Barth A, Barth L, Newell DW. Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-tert-butyl- nitrone enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. Exp.Neurol. 1996;141:330-36.

22. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. Stroke 1995;26:1086-91.

23. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke 1986;17:472-76.

24. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. Stroke 1996;27:1616-23.

25. Belfort MA, Moise KJ, Jr. Effect of magnesium sulfate on maternal brain blood flow in preeclampsia: a randomized, placebo-controlled study. Am.J.Obstet.Gynecol. 1992;167:661-66.

26. Bem JL, Peck R. Dextromethorphan. An overview of safety issues. Drug Saf. 1992;7:190-99.

27. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in the rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J.Neurochem. 1984;43:1369-74.

28. Bering EA, Jr. Effects of profound hypothermia and circulatory arrest on cerebral oxygen metabolism and cerebrospinal fluid electrolyte composition in dogs. J.Neurosurg. 1974;40:199-205.

29. Black, K. L., Weidler, D. J., and Randall, O. S. Improved cerebral microcirculation in focal cerebral ischemia after treatment with pentobarbital. Clin.Res. 27, A714. 1979. Ref Type: Abstract

30. Blair JL, Warner DS, Todd MM. Effects of elevated plasma magnesium versus calcium on cerebral ischemic injury in rats. Stroke 1989;20:507-12.

31. Boisvert DP, Hall ED. Tirilazad prevention of reperfusion edema after focal ischemia in cynomolgus monkeys. Can.J.Neurol.Sci. 1996;23:46-52.

32. Britton P, Lu XCM, Laskosky MS, Tortella FC. Dextromethorphan protects against cerebral injury following transient, but not permanent, focal ischemia in rats. Life Sci. 1997;60:1729-40.

33. Browne SE, McCulloch J. AMPA receptor antagonists and local cerebral glucose utilization in the rat. Brain Res. 1994;641:10-20.

34. Buchan AM, Xue D, Huang ZG, Smith KH, Lesiuk H. Delayed AMPA receptor blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia. Neuroreport 1991;2:473-76.

35. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1987;7:729-38.

36. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. Stroke 1989;20:904-10.

37. Cao XH, Phillis JW. Alpha-phenyl-tert-butyl-nitrone reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. Brain Res. 1994;644:267-72.

38. Cardell M, Boris-Möller F, Wieloch T. Hypothermia prevents the ischemia-induced translocation and inhibition of protein kinase C in the rat striatum. J.Neurochem. 1991;57:1814-17.

39. Carpenter CL, Marks SS, Watson DL, Greenberg DA. Dextromethorphan and dextrorphan as calcium channel antagonists. Brain Res. 1988;439:372-75.

40. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke 1996;27:1124-29.

41. Chan PH, Longar S, Fishman RA. Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema. Ann.Neurol. 1987;21:540-47.

42. Chen G, Griffin M, Poyer JL, McCay PB. HPLC procedure for the pharmacokinetic study of the spin- trapping agent, alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone (PBN). Free Radic.Biol.Med. 1990;9:93-98.

43. Chen JF, Adachi N, Tsubota S, Nagaro T, Arai T. Dexamethasone augments ischemia-induced extracellular accumulation of glutamate in gerbil hippocampus. Eur.J.Pharmacol. 1998;347:67-70.

44. Chi OZ, Pollak P, Weiss HR. Effects of magnesium sulfate and nifedipine on regional cerebral blood flow during middle cerebral artery ligation in the rat. Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 1990;304:196-205.

45. Chiang J, Kowada M, Ames IIA, Wright RL, Majno G. Cerebral ischemia. III. Vascular changes. Am.J.Pathol. 1968;52:455-76.

46. Chileuitt L, Leber K, McCalden T, Weinstein PR. Induced hypertension during ischemia reduces infarct area after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. Surg.Neurol. 1996;46:229-34.

47. Choi DW. Dextrorphan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity. Brain Res. 1987;403:333-36.

48. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J.Neurosci. 1987;7:369-79.

49. Choi DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. J.Neurosci. 1990;10:2493-501.

50. Colbourne F, Sutherland G, Corbett D. Postischemic hypothermia. A critical appraisal with implications for clinical treatment. Mol.Neurobiol. 1997;14:171-201.

51. Collins RC, Dobkin BH, Choi DW. Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke. Ann.Intern.Med. 1989;110:992-1000.

52. Conroy BP, Lin CY, Jenkins LW, DeWitt DS, Zornow MH, Uchida T *et al.* Hypothermic modulation of cerebral ischemic injury during cardiopulmonary bypass in pigs. Anesthesiology 1998;88:390-402.

53.Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. Prog.Neurobiol. 1998;54:531-48.

54. Cox JW, Sage GP, Wynalda MA, Ulrich RG, Larson PG, Su CC. Plasma compatibility of injectables: comparison of intravenous U-74006F, a 21-aminosteroid antioxidant, with Dilantin brand of parenteral phenytoin. J.Pharm.Sci. 1991;80:371-75.

55. Croughwell N, Smith LR, Quill T, Newman M, Greeley W, Kern F *et al.* The effect of temperature on cerebral metabolism and blood flow in adults during cardiopulmonary bypass. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 1992;103:549-54.

56. Davis M, Perry RH, Mendelow AD. The effect of non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonism on cerebral oedema and cerebral infarct size in the aging ischaemic brain. Acta Neurochir.Suppl.Wien. 1997;70:30-33.

57. Davis S, Helfaer MA, Traystman RJ, Hurn PD. Parallel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after incomplete global cerebral ischemia in dogs. Stroke 1997;28:198-204.

58. de Courten-Myers GM, Myers RE, Schoolfield L. Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats. Stroke 1988;19:623-30.

59. De Ryck M, Keersmaeckers R, Duytschaever H, Claes C, Clincke G, Janssen M *et al.* Lubeluzole protects sensimotor function and reduces infarct size in a photochemical stroke model in rats. J.Pharmacol.Exp.Ther. 1996;279:748-58.

60. Demopoulos H, Flamm E, Seligman M, Power R, Pietronigro D, Ransohoff J. Molecular pathology of lipids in the CNS membranes, In: Jobsis FF, editor. Oxygen and physiological functions. Dallas: Professional Information Library; 1977. p. 491-508.

61. Dempsey RJ, Combs DJ, Maley ME, Cowen DE, Roy MW, Donaldson DL. Moderate hypothermia reduces postischemic edema development and leukotriene production. Neurosurgery 1987;21:177-81.

62. Diener HC, Cortens M, Ford G, Grotta J, Hacke W, Kaste M *et al.* Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment: A double-blind study with an 8-hour inclusion window comparing a 10-mg daily dose of lubeluzole with placebo. Stroke 2000;31:2543-51.

63. Diener HC, Hacke W, Hennerici M, Radberg J, Hantson L, Dekeyser J. Lubeluzole in acute ischemic stroke: A double-blind, placebo- controlled phase II trial. Stroke 1996;27:76-81.

64. Dietrich WD, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD. Brain damage and temperature: cellular and molecular mechanisms. Adv.Neurol. 1996;71:177-94.

65. Dietrich WD, Busto R, Halley M, Valdes I. The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia. J.Neuropathol.Exp.Neurol. 1990;49:486-97.

66. Dietrich WD, Lin BW, Globus MYT, Green EJ, Ginsberg MD, Busto R. Effect of delayed MK-801 (Dizocilpine) treatment with or without immediate postischemic hypothermia on chronic neuronal survival after global forebrain ischemia in rats. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1995;15:960-68.

67. Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1989;9:589-96.

68. Du C, Hu R, Hsu CY, Choi DW. Dextrorphan reduces infarct volume, vascular injury, and brain edema after ischemic brain injury. J.Neurotrauma. 1996;13:215-22.

69. Easley CS, Wartman FS, Kopelman AE, Louis TM. Effects of Nimodipine on Brain Blood Flow Following Acute Brain Ischemia in the Newborn Piglet. Dev.Pharmacol.Ther. 1992;18:65-70.

70. Eyre JA, Essex TJ, Flecknell PA, Bartholomew PH, Sinclair JI. A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres. Clin.Phys.Physiol.Meas. 1988;9:65-74.

71. Feldman Z, Gurevitch B, Artru AA, Oppenheim A, Shohami E, Reichenthal E *et al.* Effect of magnesium given 1 hour after head trauma on brain edema and neurological outcome. J.Neurosurg. 1996;85:131-37.

72. Findlay JM, Macdonald RL, Weir BK. Current concepts of pathophysiology and management of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1991;3:336-61.

73. Fleishaker JC, Hulst LK, Peters GR. The effect of phenytoin on the pharmacokinetics of tirilazad mesylate in healthy male volunteers. Clin.Pharmacol.Ther. 1994;56:389-97.

74. Fleishaker JC, Peters GR. Pharmacokinetics of tirilazad and U-89678 in ischemic stroke patients receiving a loading regimen and maintenance regimen of 10 mg/kg/day of tirilazad. J.Clin.Pharmacol. 1996;36:809-13.

75. Fleishaker JC, Peters GR, Cathcart KS, Steenwyk RC. Evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of tirilazad mesylate, a 21-aminosteroid free radical scavenger: II. Multiple-dose administration. J.Clin.Pharmacol. 1993;33:182-90.

76. Fletcher EJ, Church J, Abdelhamid K, Macdonald JF. Blockade by sigma site ligands of N-methyl-D-aspartate- evoked responses in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurones. Br.J.Pharmacol. 1995;116:2791-800.

77. Foutz AS, Pierrefiche O, Denavit Saubie M. Combined blockade of NMDA and non-NMDA receptors produces respiratory arrest in the adult cat. Neuroreport 1994;5:481-84.

78. Frazzini VI, Winfree CJ, Choudhri HF, Prestigiacomo CJ, Solomon RA. Mild hypothermia and MK-801 have similar but not additive degrees of cerebroprotection in the rat permanent focal ischemia model. Neurosurgery 1994;34:1040-45.

79. Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. Mol.Chem.Neuropathol. 1990;12:55-70.

80. Frizzell RT, Fichtel FM, Jordan MB, Weprin BE, Borchers DJ, Allen EC *et al.* Effects of etomidate and hypothermia on cerebral metabolism and blood flow in a canine model of hypoperfusion. J.Neurosurg.Anesthesiol. 1993;5:104-10.

81. Fuchsbuder T, Tramer MR, Tassonyi E. Cerebrospinal fluid passage of intravenous magnesium sulfate in neurosurgical patients. J.Neurosurg.Anesthesiol. 1997;9:324-28.

82. Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J, Takaku A. The characteristics of laser-Doppler flowmetrie for the measurement of regional cerebral blood flow. Neurosurgery 1995;36:358-64.

83. Gelmers HJ, Gorter K, de Weerdt CJ, Wiezer HJ. A controlled trial of nimodipine in acute ischemic stroke. N.Engl.J.Med. 1988;318:203-07.

84. Gelmers HJ, Hennerici M. Effect of nimodipine on acute ischemic stroke. Pooled results from five randomized trials. Stroke 1990;21:IV81-IV84.

85. Ghribi O, Callebert J, Verrecchia C, Plotkine M, Boulu RG. Blockers of NMDA-operated channels decrease glutamate and aspartate extracellular accumulation in striatum during forebrain ischaemia in rats. Fundam.Clin.Pharmacol. 1995;9:141-46.

86. Gill R. The pharmacology of a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA)/kainate antagonists and their role in cerebral ischemia. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1994;6:225-56.

87. Gill, R. and Lodge, D. The neuroprotective effects of a combination of MK-801 and NBQX in focal ischaemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 13(Suppl.1), S668. 1993. Ref Type: Abstract

88. Gill R, Woodruff GN. The neuroprotective actions of kynurenic acid and MK-801 in gerbils are synergistic and not related to hypothermia. Eur.J.Pharmacol. 1990;176:143-49.

89. Ginsberg MD, Busto R. Combating hyperthermia in acute stroke: A significant clinical concern. Stroke 1998;29:529-34.

90. Ginsberg MD, Globus MY, Busto R, Dietrich WD. The potential of combination pharmacotherapy in cerebral ischemia, In: Krieglstein J, Oberpichler H, editors. Pharmacology of cerebral ischemia 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990. p. 499-510.

91. Globus MYT, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glatamate release and free radical production following brain injury: Effects of posttraumatic hypothermia. J.Neurochem. 1995;65:1704-11.

92. Goldin SM, Subbarao K, Sharma R, Knapp AG, Fischer JB, Daly D *et al.* Neuroprotective use-dependent blockers of Na+ and Ca^{2+} channels controlling presynaptic release of glutamate. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1995;765:210-29.

93. Green AR, Cross AJ. Techniques for examining neuroprotective drugs in vivo. Int.Rev.Neurobiol. 1997;40:47-68.

94. Green EJ, Pazos AJ, Dietrich WD, Mccabe PM, Schneiderman N, Lin B *et al.* Combined postischemic hypothermia and delayed MK-801 treatment attenuates neurobehavioral deficits associated with transient global ischemia in rats. Brain Res. 1995;702:145-52.

95. Gunton RW, Scott JW, Loungheed WM. Changes in cardiac rhythm and in form of electrocardiogramm resulting from induced hypothermia in man. Am.Heart J. 1956;52:419-29.

96. Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. Am.J.Physiol. 1989;256:H1247-H1254.

97. Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory aminoacids from intra- to extracellular compartments. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1985;5:413-19.

98. Haley EC, Putman S, Anderson F, Morrison MR, Tuttle P, Passini BT *et al.* Safety Study of Tirilazad Mesylate in Patients with Acute Ischemic Stroke (Stipas). Stroke 1994;25:418-23.

99. Haley EC, Jr., Kassell NF, Apperson Hansen C, Maile MH, Alves WM. A randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cooperative study in North America. J.Neurosurg. 1997;86:467-74.

100. Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. J.Neurol.Sci. 1995;134:79-83.

101. Hall ED. Lipid peroxidation. Adv.Neurol. 1996;71:247-57.

102. Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury., In: Waxman SG, editor. Molecular and cellular approaches to the treatment of neurological diseases.. New York: Raven; 1993. p. 81-105.

103. Hall ED, Braughler JM, Yonkers PA, Smith SL, Linseman KL, Means ED *et al.* U-78517F: a potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia. J.Pharmacol.Exp.Ther. 1991;258:688-94.

104. Hall ED, McCall JM, Means ED. Therapeutic potential of the lazaroids (21-aminosteroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage. Adv.Pharmacol. 1994;28:221-68.

105. Hall ED, Pazara KE, Braughler JM. 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. Stroke 1988;19:997-1002.

106. Hall ED, Pazara KE, Braughler JM. Effects of tirilazad mesylate on postischemic brain lipid peroxidation and recovery of extracellular calcium in gerbils. Stroke 1991;22:361-66.

107. Hall ED, Pazara KE, Braughler JM, Linseman KL, Jacobsen EJ. Nonsteroidal lazaroid U78517F in models of focal and global ischemia. Stroke 1990;21:III83-III87.

108. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK. Biochemistry and Pharmacology of Lipid Antioxidants in Acute Brain and Spinal Cord Injury. J.Neurotrauma 1992;9:S425-S442.

109. Hall R, Murdoch J. Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part II: The pharmacology of brain protection. Can.J.Anaesth. 1990;37:762-77.

110. Haraldseth O, Gronas T, Unsgard G. Quicker metabolic recovery after forebrain ischemia in rats treated with the antioxidant U74006F. Stroke 1991;22:1188-92.

111. Harper AM, McA Ledingham I, McDowall DG. The influence of hyperbaric oxygen on blood flow and oxygen uptake of the cerebral cortex in hypovolaemic shock., In: McA Ledingham I, editor. Hyperbaric oxygenation.. Edinburgh-London: Livingstone; 1965.

112. Hasegawa Y, Fisher M, Latour LL, Dardzinski BJ, Sotak CH. MRI diffusion mapping of reversible and irreversible ischemic injury in focal brain ischemia. Neurology 1994;44:1484-90.

113. Hägerdal M, Harp J, Nilsson L, Siesjö BK. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. J.Neurochem. 1975;24:311-16.

114. Heath DL, Vink R. Magnesium sulphate improves neurologic outcome following severe closed head injury in rats. Neurosci.Lett. 1997;228:175-78.

115. Heiss WD. Acute cerebel ischemia: pathogenesis and therapy. Introduction to the theme. Arzneimittelforschung 1991;41:282-83.

116. Hennerici MG. New Aspects of Calcium Antagonists for Treatment of Cerebrovascular Disease. J.Cardiovasc.Pharmacol. 1991;18:S59-S63.

117. Henry PT, Chandy MJ. Effect of ascorbic acid on infarct size in experimental focal cerebral ischaemia and reperfusion in a primate model. Acta Neurochir.Wien. 1998;140:977-80.

118. Hewitt K, Corbett D. Combined treatment with MK-801 and nicardipine reduces global ischemic damage in the gerbil. Stroke 1992;23:82-86.

119. Himori N, Watanabe H, Akaike N, Kurasawa M, Itoh J, Tanaka Y. Cerebral ischemia model with conscious mice. Involvement of NMDA receptor activation and derangement of learning and memory ability. J.Pharmacol.Methods 1990;23:311-27.

120. Hinzmann JS, McKenna RL, Pierson TS, Han F, Kezdy FJ, Epps DE. Interaction of antioxidants with depth-dependent fluorescence quenchers and energy transfer probes in lipid bilayers. Chem.Phys.Lipids 1992;62:123-38.

121. Hirsch JA, Gibson GE. Seletive alteration of neurotransmitter release by low oyxgen in vitro. Neurochem.Res. 1984;9:1039-49.

122. Hoffman WE, Charbel FT, Munoz L, Ausman JI. Comparison of brain tissue metabolic changes during ischemia at 35 degrees and 18 degrees C. Surg.Neurol. 1998;49:85-88.

123. Huang FP, Zhou LF, Yang GY. Effects of mild hypothermia on the release of regional glutamate and glycine during extended transient focal cerebral ischemia in rats. Neurochem.Res. 1998;23:991-96.

124. Huang FP, Zhou LF, Yang GY. The effect of extending mild hypothermia on focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. Neurol.Res. 1998;20:57-62.

125. Huang QF, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM. Mg2+ protects against PCP-induced cerebrovasospasms and vascular damage in rat brain. Magnes.Trace Elem. 1990;9:44-46.

126. Hudetz AG, Lee JG, Smith JJ, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Effects of Volatile Anesthetics on Cerebrocortical Laser Doppler Flow: Hyperemia, Autoregulation, Carbon Dioxide Response, Flow Oscillations, and Role of Nitric Oxide. Adv.Pharmacol. 1994;31:577-93.

127. Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A, Reulen HJ, Schmid-Elsaesser R. Combination therapy - a promising treatment strategy for cerebral ischemia. Maturation phenomenon in cerebral ischemia. Springer Verlag 1998.

128. Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? Trends.Pharmacol.Sci. 1998;19:59-66.

129. Ibrahim B, Guiet-Bara A, Leveteau J, Challier JC, Vervelle C, Bara M. Membrane potential of smooth muscle cells of human placental chorionic vessels. Comparative effects of $MgCl_2$ and $MgSO_4$. Magnes.Res. 1995;8:127-35.

130. Ibrahim B, Leveteau J, Guiet-Bara A, Bara M. Influence of magnesium salts on the membrane potential of human endothelial placental vessel cells. Magnes.Res. 1995;8:233-36.

131. Ikawa F, Kiya K, Kitaoka T, Yuki K, Arita K, Kurisu K *et al.* [Multivariate analysis of intentional temporary vessel occlusion in aneurysmal surgery]. No.Shinkei.Geka. 1998;26:19-24.

132. Imaizumi S, Woolworth V, Fishman RA, Chan PH. Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. Stroke 1990;21:1312-17.

133. Iseri LT, French JH. Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. Am.Heart J. 1984;108:188-93.

134. Izumi Y, Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1991;11:1025-30.

135. Izumi Y, Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Reduction of infarct volume by magnesium after middle cerebral artery occlusion in rats. J.Cereb.Blood.Flow.Metab. 1991;11:1025-30.

136. Jafar JJ, Johns LM, Mullan SF. The effect of mannitol on cerebral blood flow. J.Neurosurg. 1986;64:754-59.

137. Jan M, Buchheit F, Tremoulet M. Therapeutic trial of intravenous nimodipine in patients with established cerebral vasospasm after rupture of intracranial aneurysms. Neurosurgery 1988;23:154-57.

138. Jiang Q, Chopp M, Zhang ZG, Helpern JA, Ordidge RJ, Ewing J *et al.* The effect of hypothermia on transient focal ischemia in rat brain evaluated by diffusion- and perfusion-weighted NMR imaging. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1994;14:732-41.

139. Judge ME, Sheardown MJ, Jacobsen P, Honore T. Protection against post-ischemic behavioral pathology by the α- amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) antagonist 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX) in the gerbil. Neurosci.Lett. 1991;133:291-94.

140. Juurlink BHJ, Hertz L, Yager JY. Astrocyte Maturation and Susceptibility to Ischaemia or Substrate Deprivation. Neuroreport 1992;3:1135-37.

141. Kader A, Brisman MH, Maraire N, Huh JT, Solomon RA. The effect of mild hypothermia on permanent focal ischemia in the rat. Neurosurgery 1992;31:1056-61.

142. Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. Neurosurgery 1994;35:272-77.

143. Kadoya C, Domino EF, Yang GY, Stern JD, Betz AL. Preischemic but not postischemic zinc protoporphyrin treatment reduces infarct size and edema accumulation after temporary focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1995;26:1035-38.

144. Kamme F, Wieloch T. Induction of junD mRNA after transient forebrain ischemia in the rat. Effect of hypothermia. Brain Res.Mol.Brain Res. 1996;43:51-56.

145. Kamme F, Wieloch T. The effect of hypothermia on protein synthesis and the expression of immediate early genes following transient cerebral ischemia. Adv.Neurol. 1996;71:199-206.

146. Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. J.Neurosurg. 1994;80:112-19.

147. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1994;14:620-27.

148. Karibe H, Zarow GJ, Weinstein PR. Use of mild intraischemic hypothermia versus mannitol to reduce infarct size after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. J.Neurosurg. 1995;83:93-98.

149. Karki A, Westergren H, Widner H, Johansson BB. Tirilazad Reduces Brain Edema After Middle Cerebral Artery Ligation in Hypertensive Rats. Acta Neurochir.Suppl.Wien 1994;60:310-13.

150. Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. Magnesium and cobalt, not nimodipine, protect neurons against anoxic damage in the rat hippocampal slice. Anesthesiology 1988;69:710-15.

151. Kassell NF, Haley EC, Appersonhansen C, Stat M, Alves WM, Dorsch NW *et al.* Randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A cooperative study in Europe, Australia, and New Zealand. J.Neurosurg. 1996;84:221-28.

152. Kassell NF, Hitchon PW, Gerk MK, Sokoll MD, Hill TR. Alterations in cerebral blood flow, oxygen metabolism, and electrical activity produced by high dose sodium thiopental. Neurosurgery 1980;7:598-603.

153. Kaste M, Fogelholm R, Erila T, Palomaki H, Murros K, Rissanen A *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of nimodipine in acute ischemic hemispheric stroke. Stroke 1994;25:1348-53.

154. Katsura KI, Minamisawa H, Ekholm A, Folbergrova J, Siesjö BK. Changes of Labile Metabolites During Anoxia in Moderately Hypothermic and Hyperthermic Rats - Correlation to Membrane Fluxes of K^+. Brain Res. 1992;590:6-12.

155. Kety SS, Schmidt CF. The effect of altered arterial tension of carbon dioxide and oxygen on CBF and $CMRO_2$ of normal young man. J.Clin.Invest. 1948;27:484-92.

156. Koc RK, Akdemir H, Karakucuk EI, Oktem IS, Menku A. Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. Spinal.Cord. 1999;37:29-32.

157. Kochs E, Hoffman WE, Werner C, Thomas C, Albrecht RF, Schulte am Esch J. The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome, and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. Anesthesiology 1992;76:245-52.

158. Kohno K, Back T, Hoehn Berlage M, Hossmann KA. A modified rat model of middle cerebral artery thread occlusion under electrophysiological control for magnetic resonance investigations. Magn.Reson.Imaging 1995;13:65-71.

159. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn.J.Stroke 1986;8:1-8.

160. Koroshetz WJ, Moskowitz MA. Emerging treatments for stroke in humans. TIPS 1996;17:227-33.

161. Korosue K, Heros RC. Mechanism of Cerebral Blood Flow Augmentation by Hemodilution in Rabbits. Stroke 1992;23:1487-92.

162. Kozlowski P, Buchan AM, Tuor UI, Xue D, Huang ZG, Chaundy KE *et al.* Effect of temperature in focal ischemia of rat brain studied by 31P and 1H spectroscopic imaging. Magn.Reson.Med. 1997;37:346-54.

163. Krieglstein J, Lippert K, Poch G. Apparent independent action of nimodipine and glutamate antagonists to protect cultured neurons against glutamate induced damage. Neuropharmacology 1996;35:1737-42.

164. Kubota M, Nakane M, Narita K, Nakagomi T, Tamura A, Hisaki H *et al.* Mild hypothermia reduces the rate of metabolism of arachidonic acid following postischemic reperfusion. Brain Res. 1998;779:297-300.

165. Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 1995;26:1655-57.

166. Kuluz JW, Prado R, Chang J, Ginsberg MD, Schleien CL, Busto R. Selective brain cooling increases cortical cerebral blood flow in rats. Am.J.Physiol. 1993;265:H824-H827.

167. Kumar K, Wu X, Evans AT. Expression of c-fos and fos-B proteins following transient forebrain ischemia: effect of hypothermia. Brain Res.Mol.Brain Res. 1996;42:337-43.

168. Kumura E, Yoshimine T, Takaoka M, Hayakawa T, Shiga T, Kosaka H. Hypothermia suppresses nitric oxide elevation during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. Neurosci.Lett. 1996;220:45-48.

169. Kuroiwa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. Prevention of postischemic hyperthermia prevents ischemic injury of CA_1 neurons in gerbils. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1990;10:550-56.

170. Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats - Which method works best. Stroke 1993;24:294-97.

171. Lanier WL. Cerebral metabolic rate and hypothermia: Their relationship with ischemic neurologic injury. J.Neurosurg.Anesthesiol. 1995;7:216-21.

172. Lanzino G, Kassell NF, and the participants. Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in woman with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part II. A cooperative study in North America. J.Neurosurg. 1999;90:1018-24.

173. Lanzino G, Kassell NF, Dorsch NW, Pasqualin A, Brandt L, Schmiedek P *et al.* Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in woman with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part I. A cooperative study in Europe, Australia, New Zealand, and South Africa. J.Neurosurg. 1999;90:1011-17.

174. Leblanc MH, Vig V, Randhawa T, Smith EE, Parker CC, Brown EG. Use of Polyethylene Glycol-Bound Superoxide Dismutase, Polyethylene Glycol-Bound Catalase, and Nimodipine to Prevent Hypoxic Ischemic Injury to the Brain of Newborn Pigs. Crit.Care Med. 1993;21:252-59.

175. Lei B, Adachi N, Arai T. The effect of hypothermia on H2O2 production during ischemia and reperfusion: a microdialysis study in the gerbil hippocampus. Neurosci.Lett. 1997;222:91-94.

176. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. Stroke 1994;25:147-52.

177. Lesage AS, Peeters L, Leysen JF. Lubeluzole, a novel long term neuroprotectant, inhibits the glutamate-activated nitric oxide synthethase pathway. J.Pharmacol.Exp.Ther. 1996;279:759-66.

178. Lesiuk H, Sutherland G, Peeling J, Butler K, Saunders J. Effect of U74006F on forebrain ischemia in rats. Stroke 1991;22:896-901.

179. Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. Effect of Brain Edema on Infarct Volume in a Focal Cerebral Ischemia Model in Rats. Stroke 1993;24:117-21.

180. Lippert, K., Welsch, M., and Krieglstein, J. Overadditive effect of dizocilpine and NBQX against neuronal damage. J.Cereb.Blood Flow Metab. 13(Suppl.1), S672. 1993.
Ref Type: Abstract

181. Little JR. Modification of acute focal ischemia by treatment with mannitol. Stroke 1978;9:4-9.

182. Lo EH, Steinberg GK. Effects of dextromethorphan on regional cerebral blood flow in focal cerebral ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1991;11:803-09.

183. Lo EH, Steinberg GK. Effects of hypothermia on evoked potentials, magnetic resonance imaging, and blood flow in focal ischemia in rabbits. Stroke 1992;23:889-93.

184. Longuemare MC, Swanson RA. Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. J.Neurosci.Res. 1995;40:379-86.

185. Löscher W, Wlaz P, Szabo L. Focal ischemia enhances the adverse effect potential of N-methyl- D-aspartate receptor antagonists in rats. Neurosci.Lett. 1998;240:33-36.

186. MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. Nature 1986;321:519-22.

187. Magovern GJ, Jr., Bolling SF, Casale AS, Bulkley BH, Gardner TJ. The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: hyperosmolarity or hydroxyl scavenger? Circulation 1984;70(Suppl.I):I-91-I-95.

188. Marie C, Bralet J. Blood glucose level and morphological brain damage following cerebral ischemia. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1991;3:29-38.

189. Marinov MB, Harbaugh KS, Hoopes PJ, Pikus HJ, Harbaugh RE. Neuroprotective effects of preischemia intraarterial magnesium sulfate in reversible focal cerebral ischemia. J.Neurosurg. 1996;85:117-24.

190. Markarian GZ, Lee JH, Stein DJ, Hong SC. Mild hypothermia: Therapeutic window after experimental cerebral ischemia. Neurosurgery 1996;38:542-50.

191. Matsumiya N, Koehler RC, Kirsch JR, Traystman RJ. Conjugated superoxide dismutase reduces extent of caudate injury after transient focal ischemia in cats. Stroke 1991;22:1193-200.

192. Mcauley MA. Rodent models of focal ischemia. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1995;7:153-80.

193. McIntosh TK, Thomas M, Smith D, Banbury M. The Novel 21-Aminosteroid U74006F Attenuates Cerebral Edema and Improves Survival After Brain Injury in the Rat. J.Neurotrauma 1992;9:33-46.

194. McIntosh TK, Vink R, Yamakami I, Faden AI. Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. Brain Res. 1989;482:252-60.

195. McKenna R, Kezdy FJ, Epps DE. Kinetic analysis of the free-radical-induced lipid peroxidation in human erythrocyte membranes: evaluation of potential antioxidants using cis-parinaric acid to monitor peroxidation. Anal.Biochem. 1991;196:443-50.

196. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjö BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. Exp.Brain Res. 1992;89:67-78.

197. Memezawa H, Zhao Q, Smith ML, Siesjö BK. Hyperthermia nullifies the ameliorating effect of dizocilpine maleate (MK-801) in focal cerebral ischemia. Brain Res. 1995;670:48-52.

198. Metz C, Holzschuh M, Bein T, Woertgen C, Frey A, Frey I *et al.* Moderate hypothermia in patients with severe head injury: cerebral and extracerebral effects. J.Neurosurg. 1996;85:533-41.

199. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TMJ. The novel dihydronaphthyridine Ca^{2+} channel blocker CI-951 improves CBF, brain pHi, and EEG recovery in focal cerebral ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1990;10:97-103.

200. Meyer FB, Anderson RE, Sundt TMJ, Yaksh TL. Treatment of experimental focal cerebral ischemia with mannitol. Assessment by intracellular brain pH, cortical blood flow, and electroencephalography. J.Neurosurg. 1987;66:109-15.

201. Michenfelder JD, Milde JH. Influence of anesthetic agents on metabolic, functional and pathological response to regional cerebral ischemia. Stroke 1975;6:405-10.

202. Michenfelder JD, Theye RA. Hypothermia: effect on canine brain and whole-body metabolism. Anesthesiology 1968;29:1107-12.

203. Milde LN, Milde JH, Lanier WL, Michenfelder JD. Comparison of the effects of isoflurane and thiopental on neurologic outcome and neuropathology after temporary focal cerebral ischemia in primates. Anesthesiology 1988;69:905-13.

204. Minamisawa H, Mellergard P, Smith ML, Bengtsson F, Theander S, Boris-Möller F *et al.* Preservation of brain temperature during ischemia in rats. Stroke 1990;21:758-64.

205. Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjö BK. The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1990;10:365-74.

206. Miyabe M, Kirsch JR, Nishikawa T, Koehler RC, Traystman RJ. Comparative analysis of brain protection by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists after transient focal ischemia in cats. Crit.Care Med. 1997;25:1037-43.

207. Mizoi K, Suzuki J, Imaizumi S, Yoshimoto T. Development of new cerebral protective agents: the free radical scavengers. Neurol.Res. 1986;8:75-80.

208. Mohr JP, Orgogozo JM, Harrison MJG. Meta-analysis of oral nimodipine trials in acute ischemic stroke. Cerebrovasc.Dis. 1994;4:197-203.

209. Mori E, Ember J, Copeland BR, Thomas WS, del Zoppo GJ. Effect of tirilazad mesylate on middle cerebral artery occlusion/reperfusion in nonhuman primates. Cerebrovasc.Dis. 1995;5:342-49.

210. Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY *et al.* The Significance of Brain Temperature in Focal Cerebral Ischemia - Histopathological Consequences of Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1992;12:380-89.

211. Moyer DJ, Welsh FA, Zager EL. Spontaneous Cerebral Hypothermia Diminishes Focal Infarction in Rat Brain. Stroke 1992;23:1812-16.

212. Muir KW. New experimental and clinical data on the efficacy of pharmacological magnesium infusions in cerebral infarcts. Magnes.Res. 1998;11:43-56.

213. Muir KW, Lees KR. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of intravenous magnesium sulfate in acute stroke. Stroke 1995;26:1183-88.

214. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. Stroke 1995;26:503-13.

215. Muir KW, Lees KR. Dose optimization of intravenous magnesium sulfate after acute stroke. Stroke 1998;29:918-23.

216. Muizelaar JP, Marmarou A, Young HF, Choi SC, Wolf A, Schneider RL *et al.* Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase: a Phase II trial. J.Neurosurg. 1993;78:375-82.

217. Murdoch J, Hall R. Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. Can.J.Anaesth. 1990;37:663-71.

218. Müller TB, Haraldseth O, Jones RA, Sebastiani G, Lindboe CF, Unsgard G *et al.* Perfusion and diffusion-weighted MR imaging for in vivo evaluation of treatment with U74389G in a rat stroke model. Stroke 1995;26:1453-58.

219. Müller TB, Haraldseth O, Unsgard G. Characterization of the microcirculation during ischemia and reperfusion in the penumbra of a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion: A laser doppler flowmetry study. Int.J.Microcirc.Clin.Exp. 1994;14:289-95.

220. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 1989;20:1037-43.

221. Nakai A, Kuroda S, Kristian A, Siesjö BK. The immunosuppressant drug FK506 ameliorates secondary mitochondrial dysfunction following transient focal cerebral ischemia in the rat. Neurobiol.Dis. 1997;4:288-300.

222. Nehls DG, Spetzler RF. A review of cerebral protection against ischemia: part III. BNI.Quart. 1986;2(4):2-8.

223. Nehls DG, Todd MM, Spetzler RF, Drummond JC, Thompson RA, Johnson PC. A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and barbiturates during temporary focal ischemia in primates. Anesthesiology 1987;66:453-64.

224. Nellgard B, Wieloch T. Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1992;12:2-11.

225. Nemoto EM, Klementavicius R, Melick JA, Yonas H. Suppression of cerebral metabolic rate for oxygen ($CMRO_2$) by mild hypothermia compared with thiopental. J.Neurosurg.Anesthesiol. 1996;8:52-59.

226. Nishio A, Gebrewold A, Altura BT, Altura BM. Comparative effects of magnesium salts on reactivity of arterioles and venules to constrictor agents: an in situ study on microcirculation. J.Pharmacol.Exp.Ther. 1988;246:859-65.

227. Niwa M, Hara A, Iwai T, Nakashima M, Yano H, Yoshimi N *et al.* Relationship between magnitude of hypothermia during ischemia and preventive effect against post-ischemic DNA fragmentation in the gerbil hippocampus. Brain Res. 1998;794:338-42.

228. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature 1984;307:462-65.

229. Odlind B, Appelgren LE, Wolgast M. Tissue distribution of 125I-labelled bovine superoxide dismutase (SOD) in the rat. Pharmacol.Toxicol. 1988;62:95-100.

230. Ogden JA, Mee EW, Utley T. Too little, too late: does tirilazad mesylate reduce fatigue after subarachnoid hemorrhage? Neurosurgery 1998;43:782-87.

231. Ohman J, Heiskanen O. Effect of nimodipine on the outcome of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and surgery. J.Neurosurg. 1988;69:683-86.

232. Ohtaki M, Tranmer BI. Role of Hypervolemic Hemodilution in Focal Cerebral Ischemia of Rats. Surg.Neurol. 1993;40:196-206.

233. Oku K, Sterz F, Safar P, Johnson D, Obrist W, Leonov Y *et al.* Mild Hypothermia After Cardiac Arrest in Dogs Does Not Affect Postarrest Multifocal Cerebral Hypoperfusion. Stroke 1993;24:1590-97.

234. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM *et al.* Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischaemia. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 1987;50:402-10.

235. Park, C. K., Hall, E. D., Hwang, J. H., Kang, J. K., and Choi, C. R. Postischemia treatment efficacy and dose-dependency of 21- Aminosteroid U-74006F in focal cerebral infarction. J.Cereb.Blood Flow Metab. 13(Suppl.1), S144. 1993.
Ref Type: Abstract

236. Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM, McCulloch J. The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. Ann.Neurol. 1988;24:543-51.

237. Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, Goskowicz RL. Isoflurane reduces ischemia-induced glutamate release in rats subjected to forebrain ischemia. Anesthesiology 1995;82:996-1003.

238. Pellgrino LJ. A stereotaxic atlas of the rat brain, 2 ed. New York: Plenum Press; 1979.

239. Pereira BM, Chan PH, Weinstein PR, Fishman RA. Cerebral protection during reperfusion with superoxide dismutase in focal cerebral ischemia. Adv.Neurol. 1990;52:97-103.

240. Perkins WJ, Milde LN, Milde JH, Michenfelder JD. Pretreatment with U74006F improves neurologic outcome following complete cerebral ischemia in dogs. Stroke 1991;22:902-09.

241. Petkau A, Chelack WS, Kelly K, Barefoot C, Monasterski L. Tissue distribution of bovine 125I-superoxide dismutase in mice. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 1976;15:641-54.

242. Platner WS, Hosko MJ, Jr. Mobility of serum magnesium in hypothermia. Am.J.Physiol. 1953;174:273-76.

243. Plum F, Posner JB. Blood cerebrospinal fluid lactate during hyperventilation. Am.J.Physiol. 1967;212:864-70.

244. Poeck A. Neurologie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1990.

245. Prince DA, Feeser HR. Dextromethorphan protects against cerebral infarction in a rat model of hypoxia-ischemia. Neurosci.Lett. 1988;85:291-96.

246. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. Prog.Brain Res. 1985;63:29-37.

247. Pulsinelli WA, Buchan A. The NMDA receptor/ion channel: Its importance to in vivo ischemic injury to selectively vulnerable neurons, In: Krieglstein J, Oberpichler H, editors. Pharmacology of cerebral ischemia 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990. p. 169-75.

248. Rabb CH. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats (Letter). Stroke 1996;27:151.

249. Ram Z, Sadeh M, Shacked I, Sahar A, Hadani M. Magnesium sulfate reverses experimental delayed cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. Stroke 1991;22:922-27.

250. Rami A, Rabie A, Winckler J. Synergy between chronic corticosterone treatment and cerebral ischemia in producing damage in noncalbindinergic neurons. Exp.Neurol. 1998;149:439-46.

251. Reivich M. Arterial pCO_2 and cerebral hemodynamics. Am.J.Physiol. 1964;206:25-35.

252. Ridenour TR, Warner DS, Todd MM, Mcallister AC. Mild Hypothermia Reduces Infarct Size Resulting from Temporary But Not Permanent Focal Ischemia in Rats. Stroke 1992;23:733-38.

253. Robertson CS, Foltz R, Grossman RG, Goodman JC. Protection against experimental ischemic spinal cord injury. J.Neurosurg. 1986;64:633-42.

254. Rod MR, Auer RN. Combination Therapy with Nimodipine and Dizocilpine in a Rat Model of Transient Forebrain Ischemia. Stroke 1992;23:725-32.

255. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. Stroke 1997;28:2060-65.

256. Rosomoff HL. Hypothermia and cerebral vascular lesions. II. Experimental middle cerebral artery interruption followed by induction of hypothermia. Arch.Neurol.Psychiatry 1957;78:454-64.

257. Rosomoff HL, Holaday DA. Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. Am.J.Physiol. 1954;179:85-88.

258. Rothman S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. J.Neurosci. 1984;4:1884-91.

259. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. Ann.Neurol. 1986;19:105-11.

260. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor - Still lethal after eight years. Trends Neurosci. 1995;18:57-58.

261. Sapolsky RM, Pulsinelli WA. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. Science 1985;229:1397-400.

262. Schmid-Elsaesser, R., Hungerhuber, E., Zausinger, S., Baethmann, A., and Reulen, H. J. Combination drug therapy and mild hypothermia: A promising treatment strategy for reversible focal cerebral ischemia. Stroke . 1999.
Ref Type: In Press

263. Schmid-Elsaesser, R., Hungerhuber, E., Zausinger, S., Baethmann, A., and Reulen, H. J. Neuroprotective effects of the novel brain-penetrating antioxidant U-101033E and the spin-trapping agent PBN. Exp.Brain Res. 1999.
Ref Type: In Press

264. Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A, Reulen HJ. Neuroprotective efficacy of combination therapy with two different antioxidants in rats subjected to transient focal ischemia. Brain Res. 1999;816:471-79.

265. Schmid-Elsaesser R, Schröder M, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. EEG burst suppression is not necessary for maximum barbiturate protection in transient focal cerebral ischemia in the rat. J.Neurol.Sci. 1999;162:14-19.

266. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. Neuroprotective properties of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia. Acta Neurochir.Suppl.Wien. 1997;70:176-78.

267. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage by laser Doppler flowmetry. Stroke 1998.

268. Schmid-Elsaesser, R., Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A., and Reulen, H. J. Monotherapy with dextromethorphan or tirilazad - but not a combination of both - improves outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. Exp.Brain Res. 1998. Ref Type: In Press

269. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. Neuroprotective effects of combination therapy with tirilazad and magnesium in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. Neurosurgery 1999;44:163-72.

270. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Plesnila N, Baethmann A, Reulen HJ. Superior neuroprotective efficacy of a novel antioxidant (U- 101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia. Stroke 1997;28:2018-24.

271. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Westermaier T, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. Combination drug therapy and mild hypothermia: a comparison with neurosurgical standard regimen in a rat model of reversible focal cerebral ischemia. Maturation phenomenon in cerebral ischemia IV.Springer Verlag 2001;189-204.

272. Schmitt B, Netzer R, Fanconi S, Baumann P, Boltshauser E. Drug refractory epilepsy in brain damage: effect of dextromethorphan on EEG in four patients. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 1994;57:333-39.

273. Schubert A. Side effects of mild hypothermia. J.Neurosurg.Anesthes. 1995;7:139-47.

274. Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Brar P, Beal MF. Improved therapeutic window for treatment of histotoxic hypoxia with a free radical spin trap. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1995;15:948-52.

275. Schwab S, Horn M, Spranger M, Hacke W. Therapeutic hypothermia after cerebral ischemia. Theoretical basis and clinical applications. Nervenarzt 1994;65:828-35.

276. Scott P, Barsan W, Frederiksen S, Kronick S, Zink BJ, Domeier RM *et al.* A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stoke (RANTTAS). Stroke 1996;27:1453-58.

277. Seelig JM, Wei EP, Kontos HA, Choi SC, Becker DP. Effect of changes in magnesium ion concentration on cat cerebral arterioles. Am.J.Physiol. 1983;43:H22-H26.

278. Seki H, Yoshimoto T, Ogawa A, Suzuki J. Effect of mannitol on rCBF in canine thalamic ischemia: an experimental study. Stroke 1983;14:46-50.

279. Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. Science 1990;247:571-74.

280. Shirane R, Weinstein PR. Effect of mannitol on local cerebral blood flow after temporary complete cerebral ischemia in rats. J.Neurosurg. 1992;76:486-92.

281. Shiu GK, Nemoto EM. Barbiturate attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia. J.Neurochem. 1981;34:144-56.

282. Shuaib A, Ijaz S, Mazagri R, Senthilsevlvan A. CGS-19755 is neuroprotective during repetitive ischemia - This effect is significantly enhanced when combined with hypothermia. Neuroscience 1993;56:915-20.

283. Shuaib A, Waqar T, Wishart T, Kanthan R. Post-ischemic therapy with CGS-19755 (alone or in combination with hypothermia) in gerbils. Neurosci.Lett. 1995;191:87-90.

284. Siesjö BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1988;522:638-61.

285. Siesjö BK. Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia. Part I: Pathophysiology. J.Neurosurg. 1992;77:169-84.

286. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. J.Neurosurg. 1992;77:337-54.

287. Siesjö BK, Agardh CD, Bengtsson F. Free radicals and brain damage. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1989;1:165-211.

288. Siesjö BK, Ekholm A, Katsura K, Memezawa H, Ohta S, Smith ML. The type of ischemia determines the pathophysiology of brain lesions and the therapeutic response to calcium channel blockade, In: Krieglstein J, Oberpichler H, editors. Pharmacology of cerebral ischemia 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh; 1990. p. 79-88.

289. Siesjö BK, Lundgren J, Pahlmark K. The role of free radicals in ischemic brain damage: a hypothesis, In: Krieglstein J, Oberpichler H, editors. Pharmacology of cerebral ischemia 1990. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1990. p. 319-23.

290. Siesjö BK, Smith ML. The biochemical basis of ischemic brain lesions. Arzneimittelforschung 1991;41:288-92.

291. Sills MA, Loo PS. Tricyclic antidepressants and dextromethorphan bind with higher affinity to the phencyclidine receptor in the absence of magnesium and L-glutamate. Mol.Pharmacol. 1989;36:160-65.

292. Silverstein FS, Buchanan K, Johnston MV. Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high- affinityglutamate uptake into synaptosomes. J.Neurochem. 1986;47:1614-19.

293. Simon R, Shiraishi K. N-methyl-D-aspartate antagonist reduces stroke size and regional glucose metabolism. Ann.Neurol. 1990;27:606-11.

294. Sims NR. Energy Metabolism and Selective Neuronal Vulnerability Following Global Cerebral Ischemia. Neurochem.Res. 1992;17:923-31.

295. Sinclair JG, Lo GF. The blockade of serotonin uptake into synaptosomes:relationship to an interaction with monoamine oxidase inhibitors. Can.J.Physiol.Pharmacol. 1977;55:180-87.

296. Smith AL, Hoff JT, Nielsen SL. Barbiturate protection in acute focal cerebral ischemia. Stroke 1974;5:1-7.

297. Spetzler RF, Hadley MN. Protection against cerebral ischemia: the role of barbiturates. Cerebrovasc.Brain Metab.Rev. 1989;1:212-29.

298. Spetzler RF, Selman WR, Roski RA. Cerebral revascularization during barbiturate coma in primates and man. Surg.Neurol. 1982;17:111-15.

299. Steen PA, Soule EH, Michenfelder JD. Detrimental effect of prolonged hypothermia in cats and monkeys with and without regional cerebral ischemia. Stroke 1979;10:522-29.

300. Steffen JM. Glucose, glycogen, and insulin responses in the hypothermic rat. Cryobiology. 1988;25:94-101.

301. Steinberg GK, Bell TE, Yenari MA. Dose escalation safety and tolerance study of the N-methyl-D- aspartate antagonist dextromethorphan in neurosurgery patients. J.Neurosurg. 1996;84:860-66.

302. Steinberg GK, George CP, DeLaPaz R, Shibata DK, Gross T. Dextromethorphan protects against cerebral injury following transient focal ischemia in rabbits. Stroke 1988;19:1112-18.

303. Steinberg GK, Kunis D, DeLaPaz R, Poljak A. Neuroprotection following focal cerebral ischaemia with the NMDA antagonist dextromethorphan, has a favourable dose response profile. Neurol.Res. 1993;15:174-80.

304. Steinberg GK, Lo EH, Kunis DM, Grant GA, Poljak A, DeLaPaz R. Dextromethorphan alters cerebral blood flow and protects against cerebral injury following focal ischemia. Neurosci.Lett. 1991;133:225-28.

305. Steinberg GK, Saleh J, Kunis D, DeLaPaz R, Zarnegar SR. Protective effect of N-methyl-D-aspartate antagonists after focal cerebral ischemia in rabbits. Stroke 1989;20:1247-52.

306. Steinberg GK, Yoon EJ, Kunis DM, Sun GH, Maier CM, Grant GA. Neuroprotection by N-methyl-D-aspartate antagonists in focal cerebral ischemia is dependent on continued maintenance dosing. Neuroscience 1995;64:99-107.

307. Sugimura T, Sako K, Tohyama Y, Yonemasu Y. Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. Brain Res. 1998;808:313-16.

308. Sutherland G, Haas N, Peeling J. Ischemic Neocortical Protection with U74006F - A Dose Response Curve. Neurosci.Lett. 1993;149:123-25.

309. Suzuki J, Abiko H, Mizoi K, Oba M, Yoshimoto T. Protective effect of phenytoin and its enhanced action by combined administration with mannitol and vitamin E in cerebral ischaemia. Acta Neurochir. 1987;88:56-64.

310. Suzuki J, Fujimoto S, Mizoi K, Oba M. The protective effect of combined administration of anti- oxidants and perfluorochemicals on cerebral ischemia. Stroke 1984;15:672-79.

311. Suzuki J, Imaizumi S, Kayama T, Yoshimoto T. Chemiluminescence in hypoxic brain--the second report: cerebral protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid. Stroke 1985;16:695-700.

312. Taylor CP, Meldrum BS. Na+ channels as targets for neuroprotective drugs. Trends Pharmacol.Sci. 1995;16:309-16.

313. Thordstein M, Bagenholm R, Thiringer K, Kjellmer I. Scavengers of free oxygen radicals in combination with magnesium ameliorate perinatal hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Pediatr.Res. 1993;34:23-26.

314. Thurnau GR, Kemp DB, Jarvis A. Cerebrospinal fluid levels of magnesium in patients with preeclampsia after treatment with intravenous magnesium sulfate: a preliminary report. Am.J.Obstet.Gynecol. 1987;157:1435-38.

315. Tohyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Hypothermia attenuates the activation of protein kinase C in focal ischemic rat brain: dual autoradiographic study of [H-3]phorbol 12,13-dibutyrate and iodo[C-14]antipyrine. Brain Res. 1998;782:348-51.

316. Tortella FC, Ferkany JW, Pontecorvo MJ. Anticonvulsant effects of dextrorphan in rats: possible involvement in dextromethorphan-induced seizure protection. Life Sci. 1988;42:2509-14.

317. Tortella FC, Klette KL, Decoster MA, Davis BJ, Newman AH. Dextromethorphan analogs are neuroprotective in vitro and block glutamate-induced excitotoxic calcium signals in neurons. Neurosci.Lett. 1995;198:79-82.

318. Tortella FC, Martin DA, Allot CP, Steel JA, Blackburn TP, Loveday BE *et al.* Dextromethorphan attenuates post-ischemic hypoperfusion following incomplete global ischemia in the anesthetized rat. Brain Res. 1989;482:179-83.

319. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. J.Appl.Physiol. 1991;71:1185-95.

320. Trube G, Netzer R. Dextromethorphan: Cellular effects reducing neuronal hyperactivity. Epilepsia 1994;35:S62-S67.

321. Tsuda T, Kogure K, Nishioka K, Watanabe T. Mg2+ administered up to twenty-four hours following reperfusion prevents ischemic damage of the Ca1 neurons in the rat hippocampus. Neuroscience 1991;44:335-41.

322. Uematsu D, Araki N, Greenberg JH, Sladky J, Reivich M. Combined therapy with MK-801 and nimodipine for protection of ischemic brain damage. Neurology 1991;41:88-94.

323. Uenohara H, Imaizumi S, Suzuki J, Yoshimoto T. The protective effect of mannitol, vitamin E and glucocorticoid on ischaemic brain injury: evaluation by chemiluminescence, energy metabolism and water content. Neurol.Res. 1988;10:73-80.

324. Uyama O, Matsuyama T, Michishita H, Nakamura H, Sugita M. Protective effects of human recombinant superoxide dismutase on transient ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. Stroke 1992;23:75-81.

325. Vacanti FX, Ames A3. Mild hypothermia and Mg++ protect against irreversible damage during CNS ischemia. Stroke 1984;15:695-98.

326. Valtysson J, Hillered L, Andine P, Hagberg H, Persson L. Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation. Acta Neurochir. 1994;129:58-63.

327. Villa RF, Gorini A. Pharmacology of lazaroids and brain energy metabolism: a review. Pharmacol.Rev. 1997;49:99-136.

328. Wahlgren NG. Neuroprotectants in late clinical development: a status report. Cerebrovasc.Dis. 1997;7 (Suppl.):13-17.

329. Westermaier T, Zausinger S, Baethmann A, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R. No additional neuroprotection provided by barbiturate-induced burst suppression under mild hypothermic conditions in rats subjected to reversible focal ischemia. J.Neurosurg. 2000;93:835-44.

330. Woodworth JR, Dennis SR, Moore L, Rotenberg KS. The polymorphic metabolism of dextromethorphan. J.Clin.Pharmacol. 1987;27:139-43.

331. Xue D, Slivka A, Buchan AM. Tirilazad reduces cortical infarction after transient but not permanent focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1992;23:894-99.

332. Yamashita K, Eguchi Y, Kajiwara K, Ito H. Mild hypothermia ameliorates ubiquitin synthesis and prevents delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. Stroke 1991;22:1574-81.

333. Yoshida K, Burton GF, Mckinney JS, Young H, Ellis EF. Brain and tissue distribution of polyethylene glycol conjugated superoxide dismutase in rats. Stroke 1992;23:865-69.

334. Yoshimoto T, Kayama T, Suzuki J. Treatment of cerebral arteriovenous malformation. Neurosurg.Rev. 1986;9:279-85.

335. Young B, Runge JW, Waxman KS, Harrington T, Wilberger J, Muizelaar JP *et al.* Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled trial [see comments]. JAMA 1996;276:538-43.

336. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. Brain Res.Brain Res.Protoc. 2002;9:112-21.

337. Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. Brain Res. 2000;863:94-105.

338. Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989;20:84-91.

339. Zhang JP, Sun GY. Free fatty acids, neutral glycerides, and phosphoglycerides in transient focal cerebral ischemia. J.Neurochem. 1995;64:1688-95.

340. Zhang L, Mitani A, Yanase H, Kataoka K. Continuous monitoring and regulating of brain temperature in the conscious and freely moving ischemic gerbil: effect of MK-801 on delayed neuronal death in hippocampal CA1. J.Neurosci.Res. 1997;47:440-48.

341. Zhao H, Asai S, Kanematsu K, Kunimatsu T, Kohno T, Ishikawa K. Real time monitoring of the effects of normothermia and hypothermia on extracelluar glutamate reuptake in the rat following global brain ischemia. Neuroreport. 1997;8:2389-93.

342. Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. Brain Res. 1994;649:253-59.

343. Zhu CZ, Auer RN. Graded hypotension and MCA occlusion duration: effect in transient focal ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metab. 1995;15:980-88.

344. Zolamorgan S, Squire LR, Rempel NL, Clower RP, Amaral DG. Enduring Memory Impairment in Monkeys After Ischemic Damage to the Hippocampus. J.Neurosci. 1992;12:2582-96.

Danksagung

Nach Beendigung dieser Arbeit gilt mein ganz besonderer Dank:

Herrn **Priv. Doz. Dr. Robert Schmid-Elsaesser** für die Vergabe dieses faszinierenden Themas. Er führte mich in das komplexe Gebiet der zerebralen Ischämie ein und vermittelte mir in freundschaftlicher Weise die Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit. Er begleitete mich stets mit fachlichen Ratschlägen und konstruktiver Kritik. Seiner uneingeschränkten Unterstützung ist der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit zu verdanken.

Herrn **Prof. Dr. Drs. h.c. mult. Konrad Meßmer**, Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, für die überaus freundliche Aufnahme an das Institut. Die wissenschaftliche Arbeit am Institut stellt nicht zuletzt aufgrund seines unerschöpflichen Ideenreichtums und seines disziplinierten und stets kooperativen Führungsstils eine wertvolle Erfahrung dar.

Herrn **Prof. Dr. Alexander Baethmann**, Leiter der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“ für die sehr freundlich-familiäre Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Er hat in mir die Begeisterung und das Engagement für die experimentelle Neurochirurgie geweckt und hat in wertvollen Diskussionen mein pathophysiologisches Verständnis für die zerebrale Ischämie vertieft.

Herrn **Dr. Stefan Zausinger**, der mir durch die Anleitung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der aufwendigen Versuche eine große Hilfe war. Er entwickelte durch seine präzise und stets kritische Arbeitsweise ein führendes Modell der zerebralen Ischämie. Nicht zuletzt seine aufwendigen Vorarbeiten ermöglichten mir den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Dr. Jürgen Peters und **Dr. Nick Plesnila** sowie dem gesamten „**Hirnteam**“ für die freundliche Integration, die kameradschaftliche Zusammenarbeit und die mannigfaltige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Mein weiterer aufrichtiger Dank gilt den MTAs **Claudia Guggenmoos, Monika Fürst** und **Ingrid Kölbl**, für die sorgfältige Anfertigung der histologischen Präparate sowie die stete Hilfsbereitschaft bei den Versuchen.

Mein herzlicher Dank gilt auch meiner Ehefrau **Claudia** und meiner **Familie**. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung und ohne ihre Toleranz wäre es nicht möglich gewesen, dieses Projekt zu vollenden.

Das Projekt wurde durch Zuwendungen der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** (Schm 1067/2-1) und der **Friedrich Baur Stiftung** unterstützt. Ohne deren Beihilfe wären die vorliegende und andere Arbeiten nicht realisierbar gewesen. Dafür gebührt den beiden Institutionen hohe Anerkennung.

Lebenslauf

Edwin Friedrich Hungerhuber

Geburtsdatum:	10.12.1971
Geburtsort:	Trostberg
Eltern:	Franz und Maria Hungerhuber
Familienstand:	verheiratet seit 02.05.2003
	Ehefrau Claudia Hungerhuber (geb. Zenger)

Schulausbildung:

1978 - 1982:	Grundschule Waldhausen
1982 - 1991:	Luitpold-Gymnasium Wasserburg a. Inn
1991 - 1993:	Zivildienst: Stiftung Ecksberg/Mühldorf a. Inn

Studium:

1993 - 2000:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/1999 – 09/1999	Stipendium an der Harvard University Medical School im Rahmen der Munich-Harvard-Alliance for Medical Education
Juni 2000:	Abschluss des Medizinstudiums

Ärztliche Tätigkeit:

07/2000 – 01/2002	Arzt im Praktikum, Urologische Klinik und Poliklinik Großhadern Klinikum Großhadern, Prof. Dr. Drs. h.c. mult. A. Hofstetter
Seit 01/2002	Assistent der Urologischen Klinik und Poliklinik Großhadern Klinikum Großhadern, Prof. Dr. Drs. h.c. mult. A. Hofstetter