

Mechanische und pharmakologische Druckentlastung bei raumfordernden Hirninfarkten

Neue Wege in der Akuttherapie des Schlaganfalls?

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kai Udo Volk
aus Pohlheim

Gießen 2011

Aus der Neurologischen Klinik
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. M. Kaps

Gutachter: Prof. Dr. T. Gerriets

Gutachter: PD Dr. M. Oertel

Tag der Disputation: 16.04.2012

Für meine Eltern, Silke und Lea

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	6
1.	Versuchstiere	6
2.	Anästhesie	6
3.	Fadenmodell zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien	6
4.	RNase	7
5.	Kraniektomie	8
5.1	Unilaterale Kraniektomie	8
5.2	Bilaterale Kraniektomie	8
5.3	Sham-OP	9
5.4	Intrazerebrale Temperaturmessung	9
6.	MRT-Technik	10
6.1	Physikalische Grundlagen	10
6.2	Gerätetechnik	12
6.3	Fixierung und Versorgung der Versuchstiere im MRT	13
6.4	Positionierung und Feinjustierung	13
6.5	T2- gewichtete Bildgebung	14
6.6	T2*- Bildgebung	14
6.7	Diffusionsgewichtete Bildgebung	14
6.8	Evaluation der MRT-Daten	15
6.8.1	Computergestützte Planimetrie	15
6.8.2	Quantifizierung der Mittellinienverlagerung (MLV)	16
6.8.3	Bestimmung der T2-Relaxationszeit	17
7.	Klinisch-neurologische Untersuchung	18
7.1	Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung und der Vigilanz	18
7.2	Rotarod-Test	19

Inhaltsverzeichnis	II
8. Post-Mortem-Diagnostik	20
8.1 Gewebeentnahme	20
8.2 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts	20
9. Statistik	21
10. Studiendesign	22
10.1 Experiment I („Pilotstudie“): Etablierung der Kraniektomie im Tiermodell	22
10.1.1 Ziel	22
10.1.2 Studienablauf	22
10.2 Experiment II: Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf die kortikale Temperatur	23
10.2.1 Ziel	23
10.2.2 Studienablauf	23
10.3 Experiment III: Einfluss der Kraniektomie auf das Infarktvolumen	24
10.3.1 Ziel	24
10.3.2 Studienablauf	24
10.3.3 Ausschlusskriterien	25
10.4 Experiment IV: Neuroprotektive Wirkung von RNase	25
10.4.1 Ziel	25
10.4.2 Studienablauf	25
10.5 Experiment V: Wirkung von RNase bei kraniektomierten Tieren	26
10.5.1 Ziel	26
10.5.2 Studienablauf	26
III Ergebnisse	28
1. Experiment I: Etablierung der Kraniektomie im Tiermodell	28
2. Experiment II: Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf die kortikale Temperatur	29
3. Experiment III: Einfluss der Kraniektomie auf das Infarktvolumen	30
3.1 Ausgeschlossene Tiere	30
3.2 Klinisch-neurologische Befunde	30

Inhaltsverzeichnis	III
3.3 Ischämisches Läsionsvolumen	31
3.4 Mittellinienverlagerung	32
3.5 T2-Relaxationszeit	33
3.6 T2*-gewichtete Bildgebung	34
3.7 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts	35
4. Experiment IV: Neuroprotektive Wirkung von RNase	35
4.1 Ausgeschlossene Tiere	35
4.2 Klinisch-neurologische Untersuchung	36
4.3 Ischämisches Läsionsvolumen	37
4.4 Mittellinienverlagerung	38
4.5 T2-Relaxationszeit	38
4.6 T2*-gewichtete Bildgebung	39
4.7 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts	39
5. Experiment V: Wirkung von RNase bei kraniektomierten Tieren	40
5.1 Ausgeschlossene Tiere	40
5.2 Klinisch-neurologische Untersuchung	40
5.3 Rotarod-Test	41
5.4 Ischämisches Läsionsvolumen	41
5.5 Mittellinienverlagerung	42
5.6 T2-Relaxationszeit	43
5.7 T2*-gewichtete Bildgebung	43
5.8 Bestimmung des Nass-Trockengewichts	44
6. Einfluss des Raumforderungseffekts auf die neuroprotektive Wirkung von RNase (Gegenüberstellung von Experiment IV und V)	45
IV Diskussion	48
V Zusammenfassung	69
VI Summary	72
VII Literaturverzeichnis	74
VIII Erklärung	98

Inhaltsverzeichnis	IV
IX Danksagung	99
X Lebenslauf	100
XI Anlage	101
1. Publikationsliste	101
2. Abstracts	101

I Einleitung

In den westlichen Ländern ist der Schlaganfall neben dem Herzinfarkt und den Krebserkrankungen die häufigste Todesursache. Zugleich stellt der Schlaganfall den Hauptgrund für körperliche und geistige Einschränkungen bzw. Behinderungen im Erwachsenenalter dar (Hacke et al. 2003; Sander et al. 2009).

Da die Schlaganfallinzidenz mit zunehmendem Lebensalter deutlich steigt und sich das Durchschnittsalter der Bevölkerung in Deutschland erhöhen wird, ist mit einer Verdopplung der Anzahl bis zum Jahr 2030 zu rechnen. Aktuell liegt die Inzidenz bei etwa 150–250/100.000 Einwohner, d. h. etwa 120.000–200.000 Menschen erleiden in Deutschland jährlich einen Schlaganfall (Kolominsky-Rabas et al. 1998, 2002).

In 80-90% der Schlaganfallereignisse liegt ein thrombotischer bzw. embolischer Verschluss von Hirnarterien vor und führt somit zur zerebralen Ischämie. Postischämisch läuft eine Kaskade verschiedener pathophysiologischer Prozesse ab, welche durch eine ischämiebedingte Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat und einer konsekutiven intrazellulären Kalzium-Häufung in Gang gesetzt wird. Im weiteren Verlauf spielen die Bildung freier Radikaler, komplexe Entzündungsreaktionen und schließlich Apoptoseprozesse die Schlüsselrollen bei der Entstehung des Zellschadens in der postischämischen Phase (Osuga et al. 1994; Peters et al. 1998; Arvin et al. 1996; Block et al. 1999) .

Die Nervenzellen in der minderperfundierten Infarktregion sind innerhalb weniger Minuten irreversibel geschädigt. Jedoch befindet sich in der Randzone des infarzierten Gewebes die sogenannte ischämische „Penumbra“, die erstmals 1981 von Astrup et al. definiert wurde. (Astrup et al. 1981). Als „Penumbra“ wird das zwischen nicht perfundiertem Kerngebiet und normal perfundiertem Gewebe liegende Areal bezeichnet. Im Bereich der Penumbra ist der Funktionsstoffwechsel größtenteils erloschen, allerdings ist der Strukturstoffwechsel noch vorübergehend erhalten. Dieses Areal ist innerhalb eines begrenzten Zeitfensters revitalisierbar (Ginsberg et al. 1994; Hossmann 1994; Hamann 1997).

Die einzig zugelassene, kausale Therapie des akuten Schlaganfalls besteht derzeit in der systemischen Thrombolyse mittels Tissue Plasminogen Activator (rt-PA). Jedoch ist diese Behandlung lediglich innerhalb eines eng begrenzten therapeutischen Fenster von 3 bzw. 4,5 Stunden nach Auftreten der Symptome möglich (National Institute of Neurological Disorders and Stroke 1995; Hacke et al. 2008). Innerhalb dieses Zeitfensters profitieren

deutlich mehr Patienten von einer Rekanalisation als durch Blutungskomplikationen geschädigt werden (Clark et al. 1999; Hacke et al. 1996, 2003, 2004, 2008)

Eine der bedrohlichsten Komplikationen eines Schlaganfalls ist die Ausbildung des vasogenen Hirnödems. Der raumfordende Effekt des Ödems kann den intrakraniellen Druck erhöhen und zu Verlagerungen von Hirnstrukturen führen. Hierbei ist die zerebrale Herniation mit abrupter Kompression von Hirnstammstrukturen eine gefürchtete und zumeist tödliche Komplikation. Diese tritt besonders bei Verschlüssen des Hauptstammes der A. cerebri media auf. Kommt es hierbei zu einem mit konservativen Mitteln nicht beherrschbaren Hirndruckanstieg, so liegt ein sogenannter "maligner Mediainfarkt" vor, dessen Mortalität 70 - 80% beträgt (Hacke et al. 1996; Vahedi et al. 2007). Die sogenannte "dekompressive Hemikraniektomie" stellt einen aussichtsreichen Behandlungsansatz für diese hochgradig gefährdeten Patienten dar. Bei diesem operativen Eingriff werden große Teile des Os parietale, Os frontale und des Os temporale entfernt, was zu einer deutlichen intrakraniellen Drucksenkung führt, da das ödematös anschwellende Hirngewebe durch den Trepanationsdefekt expandieren kann. Seit den 50er Jahren (Scarcella 1956) wird über dieses Verfahren in Einzelfallbeschreibungen und kleinen Fallserien berichtet (Schwab et al. 1998; Wirtz et al. 1997; Gupta et al. 2004). Kontrollierte, randomisierte Studien liegen erst seit kurzem vor und wurden von Vahedi et al. (2007) in Form einer Metaanalyse präsentiert. Dabei zeigte sich, dass sich die Mortalität maligner Mediainfarkte durch die dekompressive Hemikraniektomie von 71% auf 22% senken ließ (Vahedi et al. 2007).

In einer tierexperimentellen Studie konnten Engelhorn et al. (2002) den Nachweis erbringen, dass die Hemikraniektomie bei Versuchstieren nicht nur die zerebrale Herniation verhindern kann, sondern auch eine Verbesserung der intrakraniellen Perfussion im infarzierten Areal bewirkt (Engelhorn et al. 2002). Dies ist vermutlich auf eine Entlastung der Mikrozirkulation und / oder eine verbesserten Blutversorgung über leptomeningealen Kollateralen zurückzuführen (Engelhorn et al. 1999). Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass es durch die operative Entlastung zu einer verbesserten Durchblutung der Penumbra und damit zu einer Reduktion der Infarktausdehnung im Sinne einer "sekundären" Neuroprotektion kommt. Bereits 1995 zeigten Forsting et al. (1995) anhand von hemikraniektomierten Ratten, dass zum einen die Mortalitätsrate signifikant gesenkt, zum anderen das klinische Outcome der Versuchstiere erheblich gebessert werden konnte (Forsting et al. 1995). Diese Ergebnisse konnte erstmals 2007 von Vahedi et al. (2007) in einer großen Metaanalyse klinischer Studien bestätigt werden. Hierbei wurde das klinische Outcome von Patienten ein Jahr nach Infarkt evaluiert, die

zuvor entweder konservativ oder mittels Kraniektomie behandelt wurden (Vahedi et al. 2007). Zur objektiven Einschätzung des funktionellen Status des Patienten diente der sogenannte mRS-Score. mRS- Werte zwischen null und drei werden - angesichts der Schwere der Grunderkrankung - von der Mehrzahl der einschlägigen Autoren als "akzeptabel" eingestuft. Hingegen werden Werte von vier oder fünf auf Grund massiver Beeinträchtigungen für den Patienten als "ungünstig" gewertet (van Swieten et al. 1988) . In der erwähnten Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass operierte Patienten nach einem Jahr überraschend häufig gute bzw. sehr gute Langzeitergebnisse aufwiesen (mRS-2 bei 14 % vs. 2 % der Patienten, mRS-3 bei 29% vs. 19 %). Zudem wurde deutlich, dass die Mortalitätsrate (mRS-6) mit 22 % deutlich unterhalb der Mortalitätsrate (71%) der konservativen Behandlung lag (Abb. 1) (Vahedi et al. 2007)

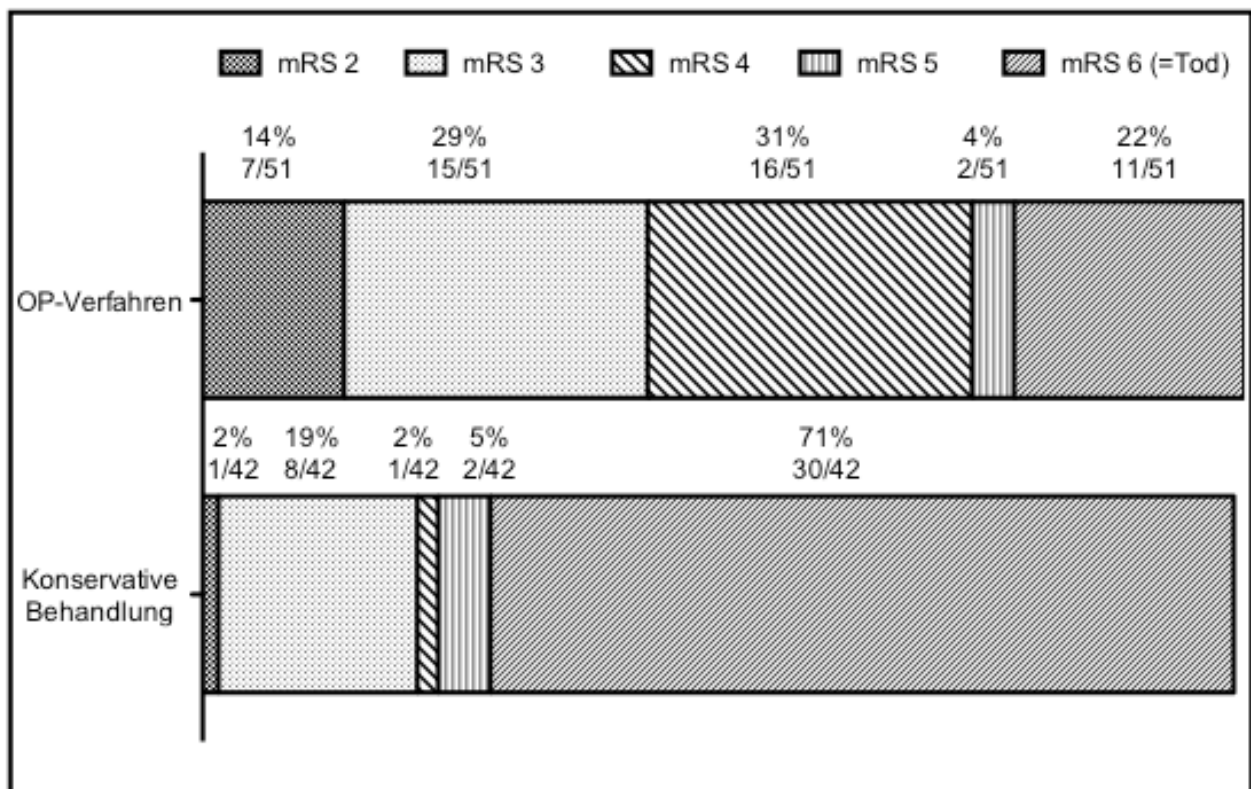


Abb. 1: Graphische Darstellung der Verteilung der mRS-Scores 12 Monate nach Behandlung mit dekompressiver Chirurgie oder konservativer Therapie (nach Vahedi et al. 2007)

Ziele

Mit der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, in welchem Ausmaß eine frühe Reduktion des vasogenen Hirnödems bzw. des hieraus resultierenden intrakraniellen Drucks zu neuroprotektiven Effekten führt. Hierzu wurde zunächst ein Tiermodell entwickelt, welches

eine fast vollständige Elimination des Hirndrucks bei malignen A. cerebri media-Infarkten erlaubt. Das Verfahren basiert auf der unilateralen (auch klinisch gebräuchlichen) "Hemikraniektomie" (Engelhorn et al. 1999; Dörfler et al. 2001), wird aber bilateral ausgeführt, was zu einer umfassenderen Drucksenkung bei gleichzeitiger Vermeidung von Herniationen am Trepanationsdefekt führt.

Mit Hilfe des Fadenmodells werden ausgedehnte Hirninfarkte erzeugt, die bezüglich Ausdehnung und Outcome malignen Mediainfarkte beim Menschen sehr ähneln. Zuvor wurden die Tiere einer bilateralen Kraniektomie oder einer Sham-Prozedur unterzogen. Nach 24 Stunden werden Mortalität und Infarktgröße zwischen diesen beiden Gruppen verglichen, um den Einfluss des ödembedingten Hirndrucks zu quantifizieren.

Eine sehr frühe Kraniektomie als neuroprotektive Präventivmaßnahme bei Hirninfarktpatienten wird in einigen Kliniken bereits praktiziert. Belastbare klinische Daten, die den Nutzen dieser sehr invasiven Vorgehensweise zur Infarktgrößenreduktion belegen würden, stehen jedoch derzeit noch aus.

Eleganter wäre auch eine frühe *pharmakologische* Behandlung des Hirnödems, um hirndruckbedingte Kollateralschäden zu vermeiden. Daher soll im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Behandlung mit RNase auf ihre mögliche "sekundär-neuroprotektive" Wirkung getestet werden. Vorarbeiten haben gezeigt, dass es durch ischämiebedingte Zellnekrosen zu einer konsekutiven Freisetzung intrazellulärer Bestandteilen in den extrazellulären Raum kommt. Zu diesen freigesetzten Substanzen gehört u.a. die RNA. Die läsionsbedingt freigesetzte RNA steigerte in erheblichem Ausmaß die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Dieser pathologische Effekt führte wiederum zu einer zusätzlichen Vergrößerung des vasogenen Hirnödems. Die RNA-induzierte Hyperpermeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird durch Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vermittelt (Fischer et al. 2007). VEGF gehört zu den potentesten physiologischen Substanzen, um die Permeabilität der Endothelzellen zu erhöhen (Dvorak et al. 1995). In vitro und später auch in-vivo konnte gezeigt werden, dass die Applikation von RNase die Wirkung der ischämisch freigesetzten RNA auf die Blut-Hirnschranke vermindert kann. Da nach intravenöser Applikation nicht nur eine Ödemreduktion nachgewiesen wurde, sondern ebenso eine Verkleinerung des Infarktareals deutlich wurde, kann dies Ausdruck eines "sekundären" neuroprotektiven Effekts sein (Fischer et al. 2007).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Art des neuroprotektiven Effekts von RNase untersucht. Dazu wurde Versuchstieren RNase intravenös verabreicht. Anschließend erfolgte eine Ischämieinduktion mit dem Fadenmodell (Prätreatment). Infarktgröße und

Ödemprogression wurden anschließend quantifiziert und Unterschiede zwischen Ratten mit intakter Schädelkalotte und primär kraniektomierten Tieren, die wohl Hirnödem, aber keinen Hirndruck entwickeln, herausgearbeitet (Walberer et al. 2009)

Hierzu musste zunächst eine Operationsmethode entwickelt werden, um eine ausreichende Expansion von anschwellendem Hirngewebe zu gewährleisten. Zur Schaffung eines adäquaten Trepanationsdefektes stand diesbezüglich insbesondere eine möglichst komplikationslose Operation im Vordergrund. Durch die operative Entfernung von Anteilen der Schädelkalotte musste in einem folgenden Versuch ausgeschlossen werden, dass es zu lokalen Kühleffekten kommt, die zu einer vermeintlichen Fehleinschätzung der neuroprotektiven Wirkung von RNase führen könnten. Nach Etablierung einer Operationsmethode wurde zur Messung der zerebralen Temperaturschwankungen kraniektomierten Versuchstieren eine intrakranielle Temperatursonde implantiert (Walberer et al. 2008).

In einem weiteren Experiment musste prinzipiell geklärt werden, in welchem Ausmaß sich eine Kraniektomie auf Infarktgröße, Ödementwicklung und klinisch-neurologischen Status der Versuchstiere auswirkte (Walberer et al. 2008). Anschließend folgte eine Dosisfindungsstudie, in der geklärt werden sollte, in welcher Dosierung RNase den größten neuroprotektiven Effekt besitzt. (Walberer et al. 2009). Die vorliegende Arbeit beschränkt sich lediglich auf die Dosis der effektivsten RNase-Dosis, die den größten ödem-und neuroprotektiven Charakter besitzt.

Nachdem jeweils der grundlegende Effekt sowohl der Kraniektomie, als auch der RNase-Therapie festgestellt werden konnte, sollte nun in kraniektomierten Versuchstieren überprüft werden, ob sich die ödem-bzw. neuroprotektive Wirkung von RNase in gleicher Weise reproduzieren lässt. Dies diene der Klärung der Frage, auf welchem Mechanismus die neuroprotektive Wirkung von RNase beruht (Walberer et al. 2009).

II Material und Methoden

1. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit männlichen Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) im Alter zwischen zehn und elf Wochen und einem Gewicht von 270 bis 350g durchgeführt. Die Versuchstiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Futtermittel (Altromin®) und wurden in Kleingruppen zu jeweils 5 Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten.

2. Anästhesie

Während des operativen Eingriffs und der nachfolgenden MRT-Untersuchung wurden die Versuchstiere mit Isofluran-Inhalation (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) narkotisiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 3,0 l/min über etwa zwei Minuten, während die Erhaltungsdosis mit 2 - 2,5% Isofluran bei 0,5 l/min reguliert wurde. Die Temperatur wurde über eine rektal eingeführte Sonde kontrolliert und mit einem thermostatisch regulierenden Wasserfluss-System zwischen 36,5 und 37,5 °C stabil gehalten.

3. Fadenmodell zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien

Erstmals wurde das Fadenmodell 1986 von Koizumi et al. (1986) beschrieben und seither von zahlreichen Arbeitsgruppen modifiziert (Kuge et al. 1995; Longa et al. 1989; Oliff et al. 1995, Uno et al. 1995). Dieses Operationsverfahren beruht auf einem Verschluss der A. cerebri media mit einem durch die A. carotis eingeführten Faden. Durch Zurückziehen dieses Fadens kann eine Reperfusion eingeleitet werden.

Der Faden besteht aus einem handelsüblichen Nylon-Monofilament (Ethilon®, Ethicon GmbH, Norderstedt). Dieser wurde an einem Ende mit einer Wärmequelle erhitzt um die Spitze abzurunden (Abb. 2), anschließend auf exakt 30 mm gekürzt und schließlich dünn mit Silikon (Provil® novo Light, Base und Catalyst; Heraeus, Deutschland) beschichtet.

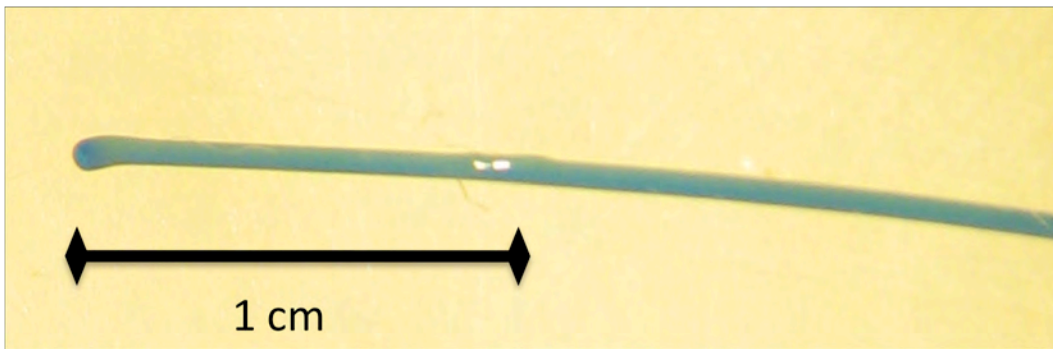


Abb. 2: Faden nach Silikonüberzug; eigene Herstellung.

Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere vom Unterkiefer bis zum Sternum rasiert. Nach einer Mittellinieninzision wurden Faszien und Muskeln freigelegt. Daraufhin erfolgte die Darstellung der A. carotis communis und deren Abgänge (A. carotis interna und -externa). Der distale Teil der A. carotis communis und die A. carotis interna wurden transient ligiert. Anschließend wurde durch eine Arteriotomie der A. carotis communis der Nylonfaden etwa 16-18mm anterograd in die A. carotis interna vorgeschoben, bis ein dezenter, elastischer Widerstand spürbar war. Dieser Widerstand signalisierte, dass sich die Fadenspitze in der A. cerebri anterior befand, was eine Perfusionsblockade in der A. cerebri media sicherstellte. Abschließend erfolgte die Fixierung des Fadens über eine Ligatur. Die Operationswunde wurde schließlich durch eine fortlaufende Naht verschlossen (Abb. 3)

Nach einer Ischämiezeit von 85 min wurden die Versuchstiere erneut einer Isofluran-Narkose unterzogen, die Operationswunde eröffnet und nach transienter Ligatur der A. carotis communis der Faden entfernt. Die Reperfusion erfolgte nach exakt 90 Minuten. Abschließend wurde die Operationswunde durch fortlaufende Naht verschlossen (Gerriets et al. 2004).

4. RNase

In den Versuchen wurde RNase A (Katalognummer: EN0531, Konzentration: 10mg/ml) der Firma Fermentas®, St.Leon-Rot verwendet. Die spezifische Aktivität beträgt >5000 u/mg. Den Versuchstieren wurden 42 µg RNase/kg-Körpergewicht in 1ml 0,9%ige NaCl-Lösung appliziert.

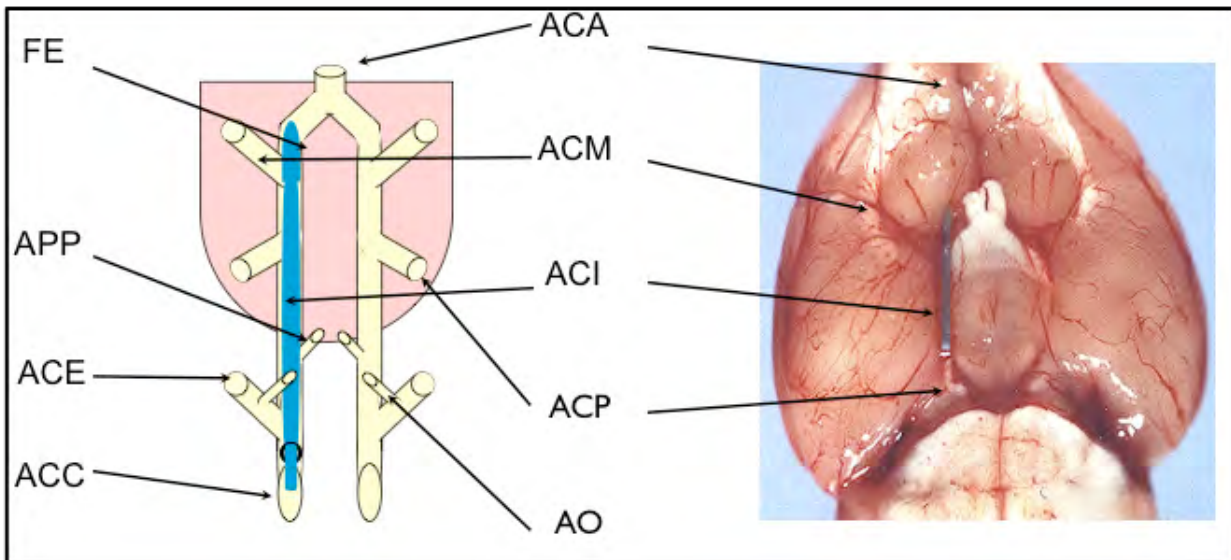


Abb. 3: Zerebrales Gefäßsystem der Ratte nach Einführung des beschichteten Fadens (schematische Zeichnung links und Foto rechts: AO: A. occipitalis, ACC: A. carotis communis, ACP: A. cerebri posterior, ACE: A. carotisexterna, APP: A. pterygopalatina, ACI: A. carotis interna mit Faden (blau), ACM: A. cerebri media, FE: aufgetriebenes Fadenende, ACA: A. cerebri anterior (modifiziert nach Walberer 2005 und Friedrich 2009)

5. Kraniektomie

5.1 Unilaterale Kraniektomie

Zunächst wurde durch einen Hautschnitt die Schädelkalotte dargestellt. Anschließend wurden mit einer wassergekühlten Diamantfräse (Dremel), die kaudalen Anteile des Os frontale und das Os parietale oberhalb der rechten Hemisphäre entfernt, so dass innerhalb der rechtsseitigen Schädelstrukturen ein Fenster von ca. 4 x 8 mm entstand. Der Eingriff erfolgte unter dem Operationsmikroskop, um Verletzungen der Dura mater zu vermeiden. Am Ende des Eingriffs wurde die Wunde sorgfältig mit Haut bedeckt und durch eine Naht verschlossen.

5.2 Bilaterale Kraniektomie

Nach Darstellung der Schädelkalotte, erfolgte mit einer wassergekühlten Fräse (Dremel) die Entfernung der kaudalen Anteile des Os frontale, des Os parietale einschließlich der ossären Anteile, die den Sinus sagittalis bedecken, so dass sich das hierbei entstandene Fenster (ca. 8 x 8 mm) über beide Hemisphären erstreckte (Abb. 4). Der Eingriff erfolgte ebenfalls unter dem Operationsmikroskop, um Verletzungen der Dura mater und

insbesondere des Sinus sagittalis superior zu vermeiden.

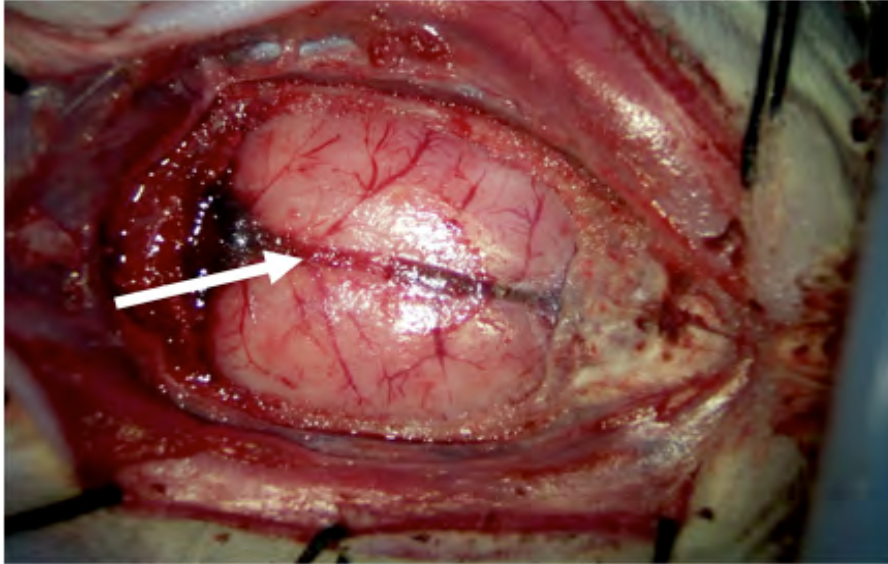


Abb. 4: Intraoperative Darstellung der bilateralen Kraniektomie. Die Dura mater und Sinus sagittalis superior (Pfeil) bleiben intakt.

Die Operationswunde wurde anschließend analog zur unilateralen Kraniektomie versorgt (Walberer et al. 2008).

5.3 Sham-OP

In der Placebogruppe erfolgte eine Sham-Prozedur. Dabei wurde die Kopfhaut inzidiert und der Schädelknochen oberflächlich aufgefräst. Eine Perforation der Kalotte wurde dabei jedoch vermieden. Das Narkoseverfahren und insbesondere die Narkosedauer wurde der Verum-Kraniektomie angeglichen, um in den Gruppen identische Bedingungen zu garantieren.

5.4 Intrazerebrale Temperaturmessung

Zur Erfassung kortikaler Temperaturveränderungen, insbesondere möglicher lokaler Kühleffekte nach bilateralen Kraniektomie, wurde in einer separaten Versuchsreihe mehreren Tieren eine intrakranielle Temperatursonde implantiert.

Nach Bohrlochtrepation des Schädels erfolgte das Einbringen der Temperatursonde knapp 2 mm tief in den Kortex (Abb. 5). Das Bohrloch wurde nach Anlage der Sonde mit Dental-Zement wieder verschlossen.

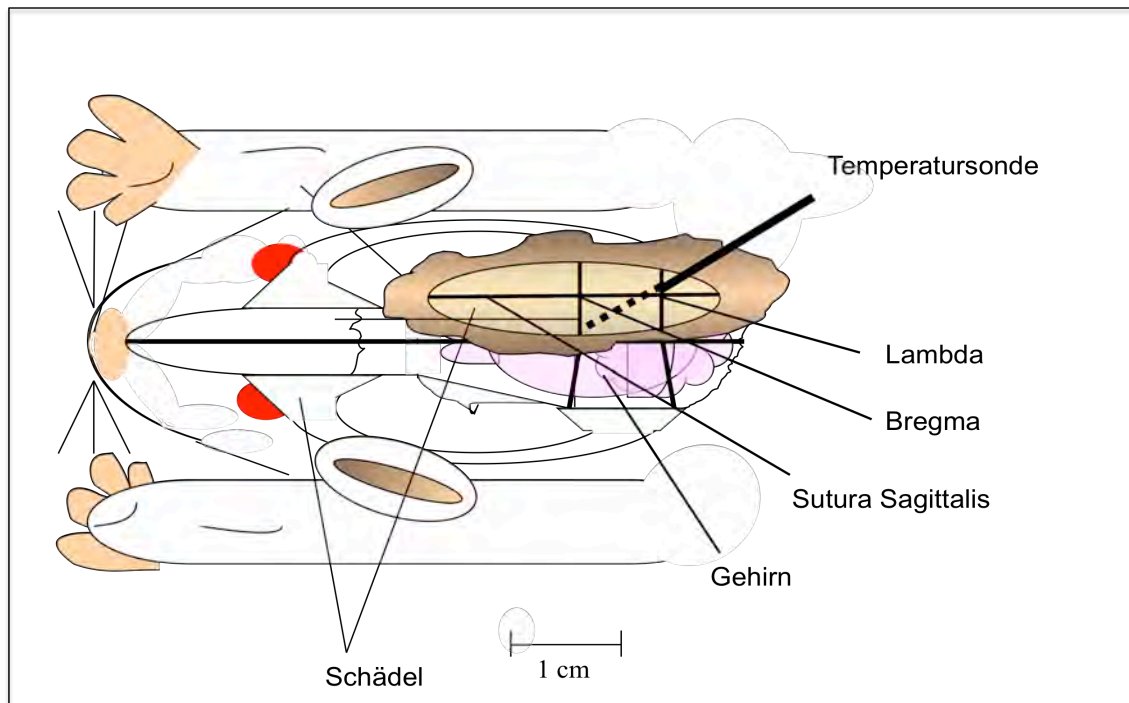


Abb. 5: Schematische Darstellung der Lage der intrakraniellen Temperatursonde.

6. MRT-Technik

6.1 Physikalische Grundlagen

Das Prinzip der Magnetresonanztomographie (MRT) wurde 1973 erstmals von Lauterbur und Mansfield (1973) beschrieben und hat seitdem eine rasante Entwicklung genommen (Lauterbur 1973; Mansfield et al. 1973). Im klinischen Alltag ist dieses bildgebende Verfahren mittlerweile nicht nur in der Neurologie weit verbreitet, sondern auch in anderen Fachdisziplinen als Diagnostikum etabliert (Schneider et al. 2007).

Die Protonen des Wasserstoffs verfügen über einen rotierenden Eigenimpuls um ihre eigene Achse, was auch als Kernspin bezeichnet wird. Auf Grund der elektrischen Ladung geht mit der Rotation ein magnetisches Moment einher. Im Ruhezustand sind die individuellen magnetischen Momente regellos ausgerichtet und neutralisieren sich gegenseitig. Durch Anlegen eines externen Magnetfelds verändert sich die Rotationsachse der Protonen durch eine abweichende Bewegung (Präzession). Die Frequenz der Präzession verändert sich in Abhängigkeit der jeweiligen Stärke des Magnetfelds und wird als Larmor-Frequenz bezeichnet (Bücheler et al. 2006).

Sobald organisches Gewebe einem solch starkem Magnetfeld ausgesetzt wird, erfolgt eine Anregung sämtlicher Protonen, die sich dann entlang der Magnetfeldlinien neu ausrichten, so dass die Anordnung entweder parallel oder antiparallel zu den

Magnetfeldlinien ausfällt. Da die parallele Anordnung energetisch geringfügig günstiger ist, wird jene als präferierte Position eingenommen. Dieser minimale Unterschied führt zu einer Längsmagnetisierung. Durch elektromagnetische Energie der Larmorfrequenz in Form eines Hochfrequenzimpulses können Protonen jene Energie absorbieren und in den angeregten Zustand übergehen, wodurch sie nun die energiereiche, antiparallele Anordnung einnehmen können. Der ursprüngliche Zustand der Längsmagnetisierung geht über in eine Quermagnetisierung. Dieser Übergang ist eine vorübergehende messbare Nettomagnetisierungsänderung und bildet die Grundlage des MRT-Signals. Nach Abschalten des Magnetfelds kehren die Protonen durch Energieabgabe wieder in ihr energieärmeres, energetisches Gleichgewicht zurück. Diesen Vorgang bezeichnet man als Relaxation und ist als Radioimpuls messbar, da die Protonen die zuvor zugeführte Energie wieder abgeben (Büchler et al. 2006; Weishaupt et al. 2006; Lehrner et al. 2006). Der Vorgang der Relaxation dauert in verschiedenen Geweben unterschiedlich lange. Im Wesentlichen ist die Relaxation bestimmt von zwei unterschiedlichen zeitlichen Komponenten, der T1-Relaxation und der T2-Relaxation. Die T1-Relaxation (Spin-Gitter-Relaxationszeit) beschreibt, wie schnell das "Zurückklappen" der angeregten Protonen in die Längsmagnetisierung geschieht. Durch Ausschalten des Hochfrequenzimpulses geht das synchrone Präzedieren verloren. Damit ist ein Rückgang der Transversalmagnetisierung verbunden, was als T2-Relaxation (Spin-Spin-Relaxation) bezeichnet wird (Schneider et al. 2007).

In experimentellen Studien ermöglicht die MRT-Technik aufgrund ihres nicht-invasiven Charakters wiederholte Messungen am gleichen Versuchstier und führt somit zu einem geringeren Verbrauch an Versuchstieren.

In den vorliegenden tierexperimentellen Studien wurden T2-, T2*- und diffusionsgewichtete MR-Sequenzen verwendet. Im akuten Schlaganfall lassen sich mittels T2-gewichteter Sequenzen erst etwa sechs Stunden nach Ereigniseintritt die ischämischen Areale in Form hyperintenser Bereiche nachweisen (Heiland et al. 1999). Unter experimentellen Untersuchungsbedingungen sind bereits nach zwanzig Minuten Hyperintensitäten in der T2-gewichteten Untersuchungstechnik nachweisbar (Gerriets et al. 2004). Die Hyperintensität wird durch die Ausbildung eines vasogenen Ödems mit vermehrter extrazellulärer Flüssigkeitsansammlung verursacht, was mit einer verlängerten T2-Relaxationszeit einhergeht. Dieser Befund persistiert auch im chronischem Stadium und bleibt als Hyperintensität zu erkennen (Trenkler 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden T2-Sequenzen genutzt, um durch die Quantifizierung der T2-Relaxationszeit in Regions of Interest quantitative Aussagen über den regionalen

Wassergehalt im Gewebe (Hirnödem) machen zu können (Gerriets et al. 2004, 2009).

T2*-gewichtete MRT-Sequenzen sind äußerst sensitiv auf Blutabbauprodukte und eignen sich zur Darlegung akuter und früher abgelaufener Blutungsereignisse (Trenkler 2008). Durch Blutabbauprodukte (v.a. Hämosiderinablagerungen) kommt es zu einer Störung des homogenen Magnetfelds im Gewebe, was zu einer verkürzten T2-Relaxationszeit führt (Hoppe et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden T2*-gewichtete Sequenzen zum Nachweis von intrakraniellen Blutungskomplikationen verwendet.

Mit der diffusionsgewichteten MR-Bildgebung lassen sich durch den Nachweis einer gestörten Wasserdiffusion Hirninfarkte sehr früh erkennen. Durch das Ischämie-bedingte Versagen der Adenosin-Triphosphat (ATP)-Pumpe kommt es zu einer Wasserabwanderung aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment (zytotoxisches Ödem), was sich durch die diffusionsgewichtete MR-Bildgebung quantifizieren lässt. Die Wasserdiffusion wird durch den Diffusionskoeffizienten (ADC=apparent diffusion coefficient) beschrieben und zeigt im infarzierten Areal bereits nach wenigen Sekunden eine eingeschränkte Diffusion an (Moseley et al. 1990; Gerriets et al. 2004, 2009).

6.2 Gerätetechnik

Sämtliche MRT-Untersuchungen wurden mit einem Kernspintomographen Bruker PharmaScan 70/16 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) angefertigt (Abb. 6). Das Gerät ist in der Lage ein Magnetfeld von 7 Tesla aufzubauen und arbeitet mit 300,51 MHz für das Isotop ^1H . Es ist mit einem abgeschirmten Gradientensystem (300 mT/m) ausgerüstet.



Abb. 6: BrukerPharmascan 70/16, 7.0 T

6.3 Fixierung und Versorgung der Versuchstiere im MRT

Mit Hilfe einer Haltevorrichtung wurden die narkotisierten Tiere in dem 60 mm fassenden, linear polarisierenden Volumenresonator platziert und fixiert. Eine Fixierung war notwendig, um vibrationsbedingte Artefakte zu vermeiden. Hierzu wurden die Schneidezähne in einer Kunststoffvorrichtung befestigt. Anschließend wurde der Kopf in eine vorgefertigte Kopfhalterung gezogen, um die Tiere auf diese Weise im MRT zu positionieren (Abb. 7). Durch zwei Öffnungen in der Haltevorrichtung wurden Zu- und Abstrom von Narkosegas und Atemluft gewährleistet. Die Narkosegaszufuhr lag bei 1 - 2% Isofluran in 0,5l/min. Die Gasdosis wurde so reguliert, dass die Atemfrequenz zwischen 50 – 70 Atemzüge/min lag. Über den kompletten Versuchszeitraum wurde die Atemfrequenz mit einer Drucksonde überwacht, die sich unterhalb des Thorax befand. Zudem wurde permanent die Körperkerntemperatur über eine Rektalsonde gemessen und mit einem rückgekoppelten Wasserzufluss-System bei 37 °C gehalten (Walberer 2005).

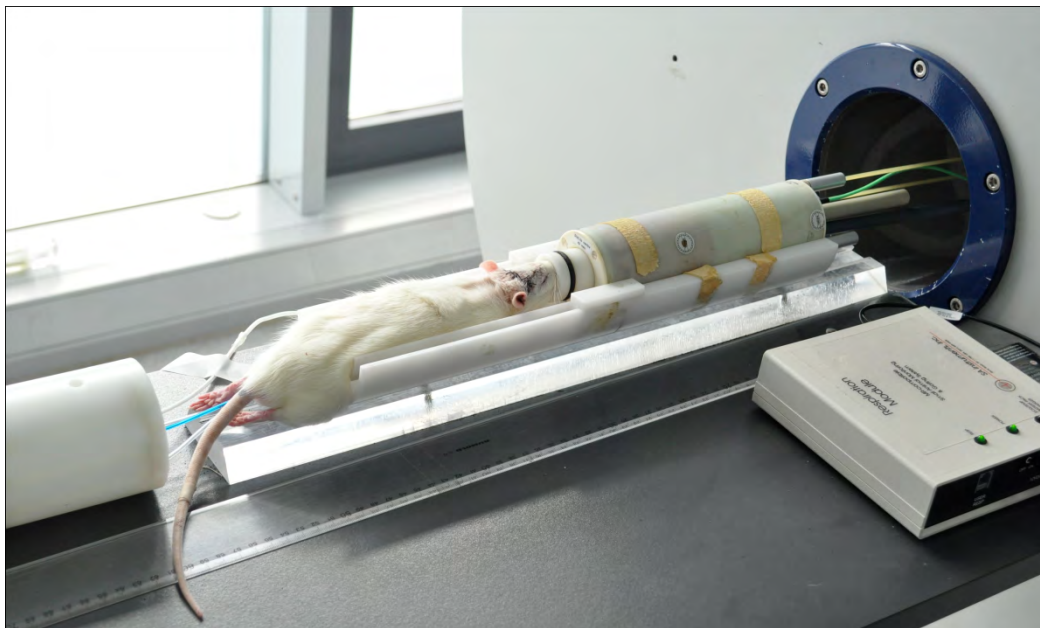


Abb. 7: Ratte in Halterung vor Platzierung im MRT. Das Tier liegt in einer mit warmen Wasser durchspülten Schale, wodurch ein Auskühlen verhindert wird.

6.4 Positionierung und Feinjustierung

Zur Beurteilung der Mittellinienverlagerung und zur Quantifizierung der Hemisphärenvolumina muss eine exakte Positionierung der Tiere im Kernspintomographen gewährleistet sein, die eine präzise koronare Schnittführung ermöglicht.

Durch die Verwendung von Spinecho-Sequenzen (Repetitionszeit (TR)= 150 ms, Echozeit (TE)= 12 ms, Schichtdicke = 4 mm) wurde die korrekte Positionierung der Ratte überprüft

und ggf. durch Verschieben oder Drehen des Resonators optimiert. Bei geringfügigen Abweichungen von der koronaren Schnitfführung wurden RARE- (Rapid acquisition with relaxation enhancement“) Sequenzen angefertigt, da diese eine präzise Beurteilung der Positionierung erlaubten. Eine RARE-Sequenz ist eine spezielle T2-gewichtete Sequenz, die durch eine sehr geringe Schichtdicke und eine äußerst kurze Messzeit (TR = 2500 ms, TE = 41,8 ms, Schichtdicke: 1 mm) charakterisiert ist. Um eine exakte koronare Schnitfführung zu gewährleisten, wurde bei Bedarf eine Winkelkorrektur vorgenommen und anschließend durch eine erneute RARE-Sequenz verifiziert. Dieser Vorgang wurde gegebenenfalls wiederholt, bis eine optimale Positionierung gegeben war (Walberer 2005).

6.5 T2- gewichtete Bildgebung

Die T2-Relaxationszeit wurde über einer CPMG (Carr Purcell MeiboomGill) Spinecho-Sequenz kartographiert. Dabei wurden acht Schichten (Dicke: 2 mm) mit einem field of view (FOV) von 37 x 37mm und einer Matrixgröße von 512 x 256 (Repetitionszeit (TR) = 3833,5 ms, 90° Anregungswinkel und 180° Refokussierungspuls, number of excitations (NEX) = 1) erfasst. Zusätzlich wurden zwölf Echos, beginnend bei TE = 18 ms (Schrittgröße $\Delta TE = 18$ ms), ermittelt. Die Akquisitionszeit für die gesamte CPMG Sequenz betrug 16 Minuten und 25 Sekunden. Unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) erfolgte die Berechnung der T2-Maps.

6.6 T2*- Bildgebung

Zum Nachweis von intra- und extrazerebralen Blutungskomplikationen wurde eine SNAP-T2*- Sequenz mit 16 aufeinander folgenden Schichten (Schichtdicke 1 mm) in koronarer Schnitfführung verwendet (FOV= 37 x 37 mm; Matrix 256 x 256; TR=43,4 ms; TE=7,0 ms; TA=12 min 7 sec).

6.7 Diffusionsgewichtete Bildgebung

Zur genauen Bestimmung des Wasser-Diffusionskoeffizienten (ADC) wurden mit einer fettunterdrückenden, echo-planaren Sequenz (EPI-Sequenz) diffusionsgewichtete Bilder erstellt. Um die Bildqualität zu optimieren, wurde ein sogenannter Volume-Shim mit einer volumenselektiven Doppel-Spinecho Spektroskopiesequenz (Repetitionszeit (TR) = 1s, Echozeit (TE) = 30 ms, Voxel-Größe 10 x 8 x 15 mm) vor Akquisition der ersten Diffusionsserie durchgeführt.

Mit der Diffusionssequenz wurden sechs aufeinander folgende koronare Schichten mit einer jeweiligen Dicke von 2mm in einem "field of view" (FOV) von 32 x 32mm und einer Matrixgröße von 128 x 128 (Repetitionszeit (TR) = 3003ms, Echozeit (TE) = 38,6 ms, 4 averages) erfasst. Die Untersuchungen wurden mit fünf unterschiedlichen Diffusionsgradientenwerten (10, 40, 70, 100 und 130 mT/m) durchgeführt, um den Diffusionskoeffizienten des Wassers (ADC) quantitativ zu erfassen. Durch die Diffusionsgradientendauer (δ) von 9 ms und die Gradientenseparationszeit (Δ) von 15 ms resultierten fünf Werte (6,96, 111,3, 340,8, 695,6 und 1175,5 s/mm²). Für die komplette EPI-Sequenz betrug die Akquisitionszeit 4,5 Minuten. Die topographischen ADC-Maps wurden daraufhin mit der Bildverarbeitungssoftware Paravision 2.1 (Bruker, Ettlingen, Deutschland) berechnet (Walberer 2005).

6.8 Evaluation der MRT-Daten

6.8.1 Computergestützte Planimetrie

Die computergestützte Planimetrie wurde auf sechs koronaren Schichten einer T2-gewichteten MR-Aufnahme des Cerebrums von rostral nach kaudal vorgenommen. Jede Schichtaufnahme wurde vorab einheitlich vergrößert und eine Helligkeits- und Kontrastkorrektur vorgenommen. Daraufhin erfolgte die Planimetrie der Hemisphären und der Infarktareale unter Verwendung eines Bildanalyse-Programms (Abb. 8) (Image J 1.25s®; National Institutes of Health, USA).

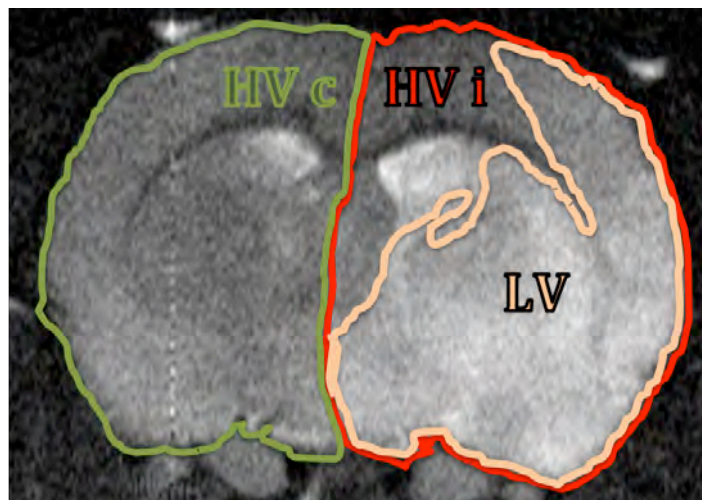


Abb. 8: Computergestützte Planimetrie einer T2-gewichteten Sequenz, 24 h nach Ischämieinduktion. Der Hirninfarkt stellt sich hell dar. LV: Läsionsvolumen, HV_c: kontralaterales Hemisphärenvolumen, HV_i: ipsilaterales Hemisphärenvolumen

In den T2-gewichteten Bildern stellten sich die Infarktareale hyperintens dar. Unter Verwendung des o.g. Bildanalyseverfahrens konnten die Größen der beiden Hemisphären (HV_i : ipsilateral bzw. HV_c : kontralateral) und das Läsionsvolumen (LV) bestimmt werden. Da sich die kontralaterale Hemisphäre in gleichem Umfang komprimiert, in der sich die ipsilaterale Hemisphäre expandiert, wurde das prozentuale unkorrigierte Läsionsvolumen ($\%HLV_u$) mit folgender Formel berechnet (Gerriets et al. 2004; Walberer et al. 2007):

$$\%HLV_u = \frac{2 \times LV_u}{HV_c + HV_i} \times 100$$

Durch die Ausbildung des vasogenen Ödems kommt es zu einer Vergrößerung des ischämischen Gewebes. Damit die ödembedingte Expansion des ischämischen Areals nicht zu einer Überschätzung der wahren Infarktgröße führt, muss das Läsionsvolumen für den raumfordernden Effekt des Ödems ($\%HLV_e$) korrigiert werden: (Gerriets et al. 2004; Walberer 2005; Friedrich 2009):

$$\%HLV_e = \frac{2 \times LV_e}{HV_c + HV_i} \times 100 = \frac{HV_c - HV_i + LV_u}{HV_c} \times 100$$

Zur Berechnung der ödembedingten Volumenzunahme der ipsilateralen Hemisphäre bzw. des Ödemvolumens ($\%HSE$, jeweils in Prozent des Hemisphärenvolumens) wurde folgende Formel verwendet : (Gerriets et al. 2004; Walberer et al. 2007):

$$\%HSE = \%HLV_u - \%HLV_e$$

6.8.2 Quantifizierung der Mittellinienverlagerung (MLV)

Zur Quantifizierung der Mittellinienverlagerung wurden ebenfalls T2-gewichtet MR-Aufnahmen verwendet. Als Orientierungspunkt diente der dritte Ventrikel, welcher sich bei allen Versuchstieren leicht detektieren ließ. Anschließend wurde jeweils die Distanz zwischen der lateralen Grenze des ipsilateralen (A) und des kontralateralen Kortex (B) zum dritten Ventrikel vermessen, wobei der am weitesten lateral gelegene Messpunkt verwendet wurde (Abb. 9) (Walberer et al. 2007). Die Mittellinienverlagerung (MLV) wurde mit folgender Formel bestimmt (Pullicino et al. 1997; Gerriets et al. 1999, 2001):

$$MLV = \frac{A - B}{2}$$

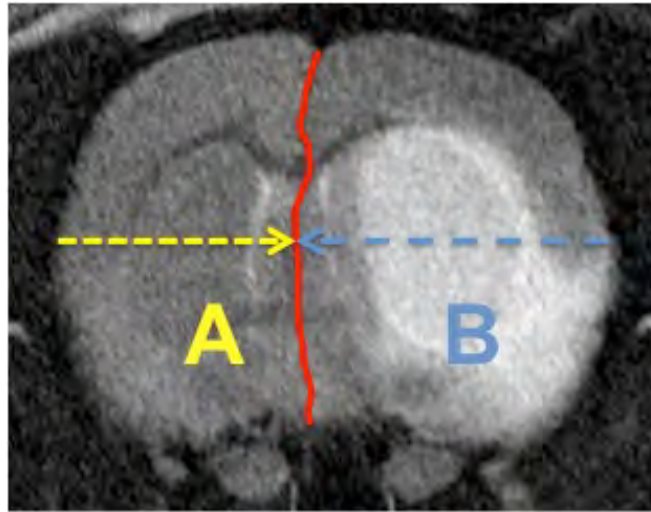


Abb. 9: Bestimmung der Mittellinienverlagerung. Gezeichnet sind die Strecken der ipsilateralen (A) und der kontralateralen (B) Messstrecke zwischen Kortex und Mittellinie (rot)

6.8.3 Bestimmung der T2-Relaxationszeit

Die Bestimmung der T2-Relaxationszeit wurde in sogenannten regions of interest (ROI) vorgenommen. Die Positionierung der ROI erfolgte im Zentrum der kortikalen und subkortikalen Anteile des Infarktes in der ipsilateralen Hemisphäre. Zusätzlich wurden ROIs in korrespondierender Position in der kontralateralen Hemisphäre platziert, um einen Seitenvergleich zu ermöglichen (Abb. 10). Nicht-ischämische Areale wurden ausgespart. Zur Analyse wurden Differenzen der jeweiligen korrespondierenden ROI gebildet und der Mittelwert der T2-Relaxationszeit über alle Schichten ermittelt, wobei kortikale und subkortikale ROIs differenziert betrachtet wurden.

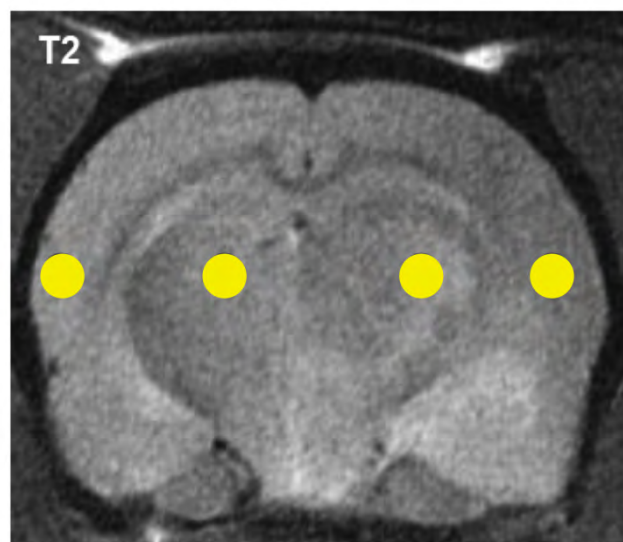


Abb. 10 : Positionierung der ROI in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre

7. Klinisch-neurologische Untersuchung

7.1 Quantifizierung der motorischen Beeinträchtigung und der Vigilanz

Die klinische Untersuchung zur Quantifizierung der neurologischen Ausfälle basierte auf einer von Zea Longa et al. entwickelten modifizierten 6-Punkte Skala (Longa et al. 1989).

Die Skala setzte wie folgt zusammen (Abb. 11):

0	Keine neurologische Beeinträchtigung
1	Extensionsdefizit der linken Vorderpfote
2	Gangabweichung nach rechts („Circling“)
3	Fallneigung nach links
4	Verlust der Gehfähigkeit; Vigilanzminderung
5	Tod

Abb. 11: Modifizierte 6-Punkte-Skala nach Longa et al. (1989) zur Quantifizierung neurologischer Defizite bei Nagern.

Zu Beginn der Untersuchung wurden die Versuchstiere in etwa 30 cm Höhe am Schwanz angehoben. Normalerweise kommt es daraufhin zu einer reflektorischen Extension der Vorderpfoten. Fehlt diese physiologische Reaktion auf einer Seite, wird dies als Ausdruck einer Hemiparese gedeutet (Abb. 12).



Abb. 12: Fehlende linksseitige Vorderpfotenextension, als Ausdruck einer Hemiparese links nach Infarkt der rechten Hemisphäre.

Im Anschluss wurden die Tiere auf den Boden gesetzt, um das Gangbild und Bewegungsmuster zu beurteilen. Bei Vorliegen einer moderaten Schädigung einer Hemisphäre, waren die Tiere nicht mehr in der Lage, geradeaus zu laufen und es konnte eine nach rechts tendierende Gangabweichung festgestellt werden. In schweren Fällen liefen die Ratten ausschließlich im Kreis („Circling“) (Abb. 13). Bei massiver Schädigung kam es zu einer ausgeprägten Fallneigung nach links oder schlimmstenfalls zum totalen Verlust der Gehfähigkeit (Walberer 2005).

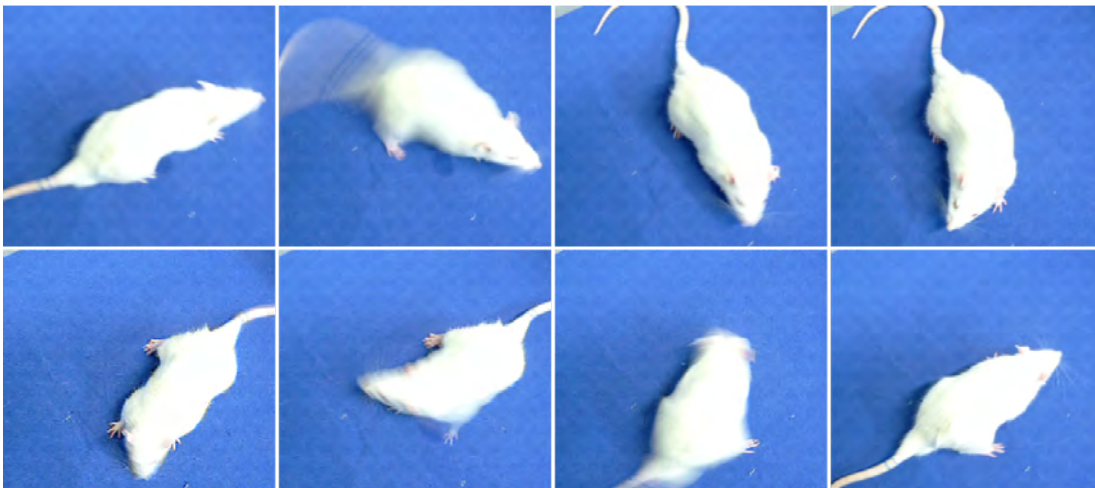


Abb. 13: Charakteristisches „Circling“ einer Ratte mit rechtsdrehender kreisender Fortbewegung (Abb. aus Walberer 2005)

7.2 Rotarod-Test

Zur ergänzenden Quantifizierung der lokomotorischen Leistungsfähigkeit diente der Rotarod-Test. Hierbei handelt es sich um ein motorbetriebenes Laufrad, auf das die Ratten gesetzt wurden. Kontinuierlich wurde die Geschwindigkeit des Laufrades erhöht, bis sich die Tiere nicht mehr auf der Vorrichtung halten konnten (Abb. 14). Die maximale Drehgeschwindigkeit, bei der die Tiere noch mitlaufen konnten, wurde dokumentiert. Der Rotarod-Test wurde sowohl vor Ischämieinduktion (Baseline) als auch 24h postischämisch durchgeführt. Abschließend wurde der Differenzbetrag der beiden Messungen berechnet.



Abb. 14: Durchführung des Rotarod-Tests.

8. Post-Mortem-Diagnostik

8.1 Gewebeentnahme

Nach Beendigung der Versuchsreihe (24h nach Ischämiebeginn) wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Dazu wurden sie zuvor mit 5% Isofluran in 3,0 l/min Luft tief narkotisiert.

Anschließend wurde die Kopfhaut durch eine Mittellinieninzision von kaudal nach rostral eröffnet, so dass die Schädelkalotte freigelegt war. Das Os occipitale wurde mit einer Knochenzange entfernt, so dass das Kleinhirn einsehbar war. Nach Durchtrennung des Os frontale mit einer Feinsäge konnte die Schädelkalotte entlang der Sutura interfrontalis eröffnet werden, um beide Kalottenhälften vom Gehirn abzuheben. Anschließend wurde die Dura mater entfernt und das präparierte Gehirn inspiziert, um mögliche, insbesondere subarachnoidale Blutungskomplikationen des Fadenmodells zu detektieren, die einen Studienausschluss des Tieres bedingt hätte.

8.2 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts

Mit der Nass-Trocken-Methode wurde postmortal eine Quantifizierung des zerebralen Wassergehalts vorgenommen. Hierbei wurde nach Trennung der beiden Hirnhälften sowohl das Gewicht der ipsi- als auch der kontralateralen Hemisphäre bestimmt

(Nassgewicht). Anschließend wurden beide Hirnhälften bei 50 °C getrocknet, um daraufhin das „Trockengewicht“ der jeweiligen Hemisphäre zu bestimmen.

Der absolute zerebrale Wassergehalt (%H₂O) der jeweiligen Hemisphäre konnte wie folgt bestimmt werden:

$$\%H_2O = \frac{\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Nassgewicht}} \times 100$$

Die Differenz des Wassergehalts (%ΔH₂O) der beiden Hemisphären konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\% \Delta H_2O = \%H_2O_{\text{ipsilateral}} - \%H_2O_{\text{kontralateral}}$$

Der erhöhte Wassergehalt der ipsilateralen, infarzierten Hemisphäre kann daher mit dem Wert %ΔH₂O quantitativ erfasst werden und entspricht dem Hirnödem (Gerriets et al. 2004).

9. Statistik

Die Messungen der Infarktgrößen wurden durch einen Untersucher durchgeführt, der für die Randomisierung der Versuchstiere und sämtliche klinischen Untersuchungen geblindet war.

Zur statistischen Analyse wurden folgende Testverfahren herangezogen und mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPadPrism® for Windows (Standardversion 4.0. GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet.

Die parametrischen Daten wurden mit dem Student's t-test analysiert, während die nicht-parametrischen Daten (Parameter der klinischen Untersuchung), durch den Mann-Whitney U-test auf signifikante Unterschiede getestet wurden.

Sämtliche Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung oder Median ± Range dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit p<0,05 festgelegt.

10. Studiendesign

10.1 Experiment I („Pilotstudie“): Etablierung der Kraniektomie im Tiermodell

10.1.1 Ziel

Zunächst sollte die Technik der Hemikraniektomie, wie Sie auch in der Therapie maligner Mediainfarkte bei Menschen üblich ist, auf die Ratte übertragen werden (Hoell et al. 2002; Vahedi et al. 2007).

10.1.2 Studienablauf

Die Untersuchung der unilateralen Kraniektomie wurde insgesamt an drei Versuchstieren durchgeführt. Nach Narkoseeinleitung wurde rechtsseitig eine Trepanation durchgeführt, um im Anschluss eine transiente fokale Ischämie mit dem Fadenmodell (siehe Kap. 3.) zu induzieren. Nach 90 Minuten erfolgte die Reperfusion durch Entfernung des okkludierenden Fadens.

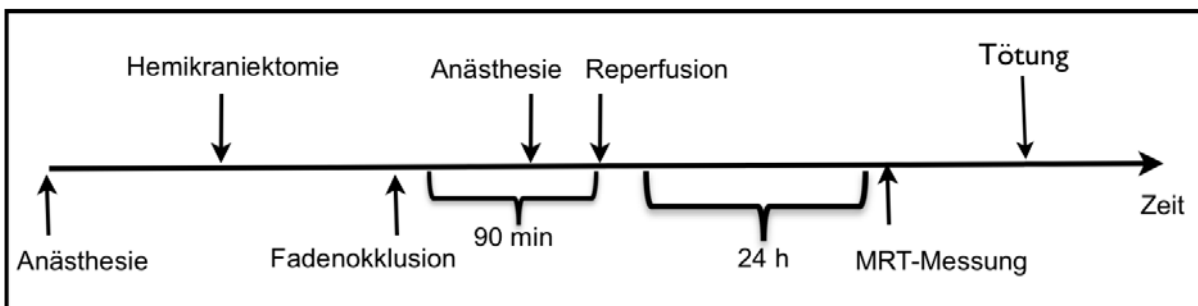


Abb. 15: Studienablauf von Experiment I

24 Stunden nach Ischämieinduktion wurde eine T2-gewichtete MRT-Untersuchung des Gehirns durchgeführt. Im Anschluss an die kernspintomographische Untersuchung wurden die Tiere in tiefer Narkose dekapitiert.

Nach Auswertung der ersten drei Versuchstiere wurde die Kraniektomie auch auf die Gegenseite ausgedehnt, um Herniationen von Hirngewebe durch die Trepanationslücke zu vermeiden und den hirndrucksenkenden Effekt der Operation zu optimieren. Dieses Verfahren wurde an drei weiteren Tieren erprobt. Der Studienablauf erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 15) (Walberer et al. 2008).

10.2 Experiment II: Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf die kortikale Temperatur

10.2.1 Ziel

In diesem Versuch wurde der Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf die zerebrale Temperatur untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die Technik der bilateralen Kraniektomie zu einer lokalen Hypothermie führt. Lokale Kühlungseffekte könnten per se neuroprotektiv wirken und somit die Studienergebnisse verfälschen (Barone et al. 1997; Hajat et al. 2000; Fisher et al. 2005).

10.2.2 Studienablauf

Zunächst erfolgte die Randomisierung von sechs Versuchstieren in zwei unterschiedliche Behandlungsgruppen. Die Tiere wurden entweder bilateral kraniektomiert (Kraniektomie; n=3) oder einer Sham-Prozedur (Kontrollgruppe; n=3) unterzogen.

Den Tieren der Kraniektomie-Gruppe wurde nach Entfernung der ossären Schädelanteile (siehe 4.2), eine Temperatursonde in den parietalen Kortex implantiert (Abb. 16). Im Anschluss wurde die Wunde mit einer Hautnaht verschlossen. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde durch eine Bohrlochtrepanation die Temperatursonde in den parietalen Kortex implantiert. Der entstandene ossäre Defekt wurde durch Dental-Zement verschlossen (Abb. 17) (Walberer et al. 2008).

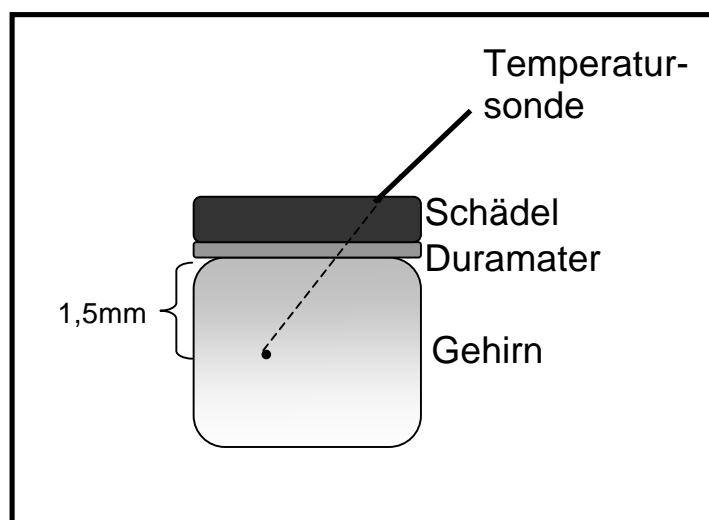


Abb. 16: Schematische Darstellung der intrakraniellen Platzierung der Temperatursonde in den parietalen Kortex

Die Körpertemperatur der Tiere beider Versuchsgruppen wurde über eine rektale Temperatursonde gemessen. Die Temperaturdifferenz zwischen kortikaler und rektaler Temperatur wurde ermittelt.

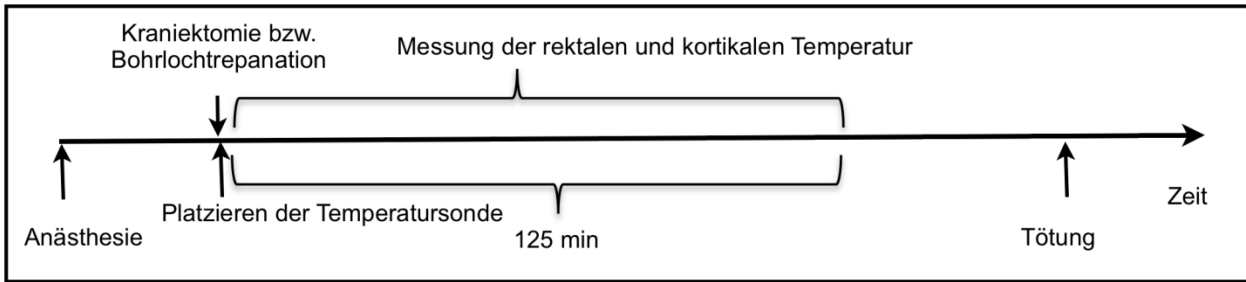


Abb. 17: Studienablauf Experiment II

10.3 Experiment III: Einfluss der Kraniektomie auf das Infarktverhalten

10.3.1 Ziel

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf das Läsionsvolumen untersucht werden. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf den neuroprotektiven Effekt einer Druckentlastung durch die bilaterale Kraniektomie liefern.

10.3.2 Studienablauf

Insgesamt wurden 24 Tiere in 2 Versuchsgruppen randomisiert. Die Tiere wurden entweder einer bilateralen Kraniektomie (n=12) (siehe 4.2) oder einer Sham-Prozedur (n=12) unterzogen (siehe 4.3) (Walberer et al. 2008).

Im Anschluss erfolgte die Ischämieinduktion mittels Fadenmodell. Nach 90-minütiger Ischämiedauer wurde die Reperfusion durchgeführt. Die klinisch-neurologischen Untersuchungen der Tiere erfolgte 5h und 24h nach Gefäßokklusion, wobei die Tiere jeweils im Anschluss kernspintomographisch untersucht wurden.

Nach der letzten MRT-Messung wurden die Tiere durch Dekapitation in tiefer Narkose getötet. Postmortal wurden die Gehirne auf Blutungshinweise inspiziert. Abschließend wurde das Nass-Trocken-Gewicht der beiden Hemisphären bestimmt (Abb. 18).

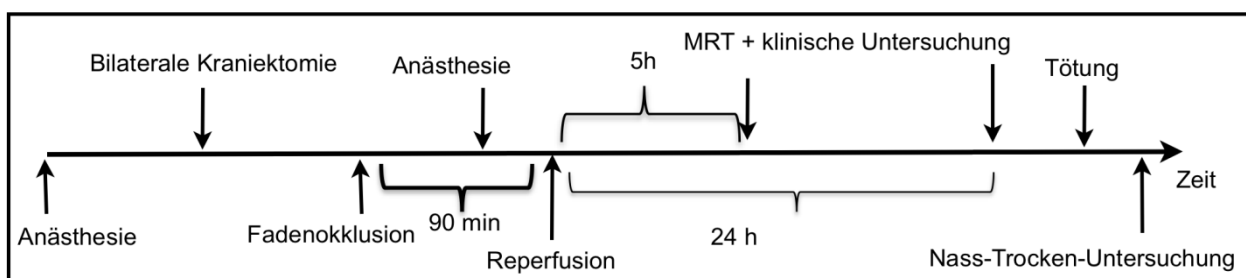


Abb. 18: Studienablauf von Experiment III

10.3.3 Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden vor Beginn der Studie definiert:

- Fehlender Nachweis eines Infarkts im Versorgungsgebiet der okkludierten A. cerebri media.
- Infarzierung lediglich im Versorgungsgebiet der A. hypothalamica und oder der A. choroidea anterior bei gleichzeitig fehlender Ischämie im A. cerebri media Gebiet (Gerriets et al. 2004)
- Postmortaler Nachweis einer Subarachnoidalblutung oder anderen intrakraniellen Blutungen.
- Tod eines Tieres vor Ablauf des Studienprotokolls.

10.4 Experiment IV: Neuroprotektive Wirkung von RNase

10.4.1 Ziel

In diesem Versuch sollte der Effekt von RNase nach Induktion einer akuten fokalen Ischämie hinsichtlich der neuroprotektiven bzw. ödemprotektiven Wirkung überprüft werden.

In einem vorausgegangen Experiment wurden unterschiedliche Dosierungen getestet, wobei die 42 µg/kg-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Dosis-Gruppen und der Placebogruppe potentiell neuroprotektiven Charakter hat. Im Folgenden wird das Experiment dieser 42µg-RNase-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe dargestellt (Friedrich 2009; Walberer et al. 2009)

10.4.2 Studienablauf

In diesem Versuch wurden 26 Tiere in zwei Behandlungsgruppen (n=13) randomisiert. Die Tiere erhielten eine intravenöse Injektion mit Placebo (1ml 0,9%ige NaCl) oder mit RNase (42 µg/kg gelöst in 1ml 0,9%ige NaCl). Versuchstiere, die gemäß der vordefinierten Kriterien (s.o.) ausgeschlossen werden mussten, wurden durch andere Tiere ersetzt, um gleichwertige Gruppengrößen zu garantieren.

Bei den narkotisierten Versuchstieren erfolgte zunächst die systemische Applikation von Placebo/RNase (gruppenabhängig) über eine Braunüle, die in die laterale Schwanzvene gelegt wurde. Nach zehn Minuten wurde die A. cerebri media durch Einführen eines Fadens okkludiert. Die Reperfusion wurde 90 min nach Okklusion durch das Zurückziehen des Fadens eingeleitet. 5h und 24h nach Infarktinduktion wurden MRT-Untersuchungen durchgeführt. Die neurologischen Untersuchungen der Tiere erfolgten jeweils 70 min, 5h

und 24h nach Verschluss der A. cerebri media und wurden anhand der 6-Punkte-Skala von Z. Longa beurteilt (Abb.19) (Longa et al. 1981).

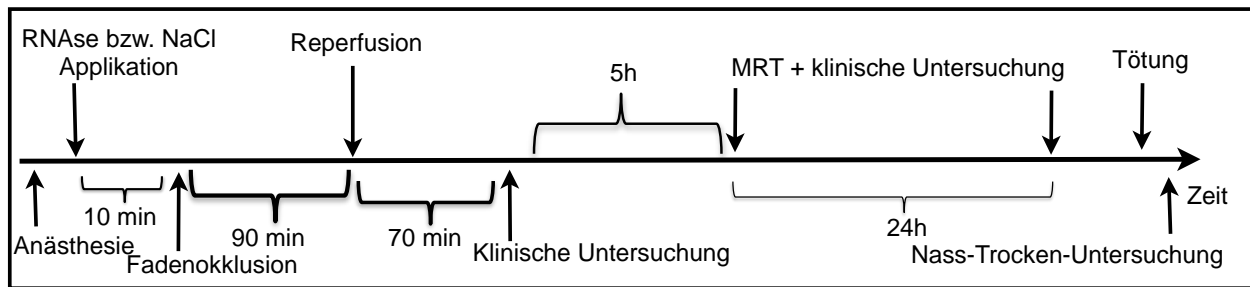


Abb.19: Studienablauf von Experiment IV

Nach der zweiten MRT-Untersuchung wurden die tief narkotisierten Tiere dekapitiert, um im Anschluss die präparierten Gehirne auf makroskopische Blutungen zu untersuchen. Abschließend wurde das Nass-Trocken-Gewichts bestimmt.

10.5 Experiment V: Wirkung von RNase bei kraniektomierten Tieren

10.5.1 Ziel

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Prätreatment mit RNase eine deutliche Ödem- und Infarktgrößenreduktion erzeugt (Friedrich 2009; Walberer et al. 2009). In dem folgenden Experiment wurde der Effekt von RNase auf das Infarktvolumen und das vasogene Ödem bei kraniektomierten Ratten untersucht. Insbesondere sollte hierbei geklärt werden, ob die pharmakologische Reduktion des Infarktvolumens mittels RNase durch die Reduktion des Ödems oder durch andere neuroprotektive Mechanismen bedingt ist. Es wurde die RNase-Dosierung verwendet, die in den Vor-Experimenten den stärksten infarkt-/ödemreduzierenden Effekt zeigte (42 µg/kg/KG) (Walberer et al. 2009).

10.5.2 Studienablauf

Für diese Studie wurden 29 Versuchstiere in zwei Untersuchungsgruppen randomisiert. Vor Durchführung der bilateralen Kraniektomie (wie unter Kapitel 4.2 beschrieben) erfolgte eine Baseline-Messung mit dem Rotarod-Test. Zehn Minuten vor Induktion der zerebralen Ischämie wurde den Versuchstieren über einen in die Schwanzvene eingeführten Venenkatheter entweder 42 µg/kg RNase (gelöst in 1 ml 0,9%ige NaCl) oder 1 ml 0,9%ige NaCl (als Placebo) appliziert. Nach 90 Minuten Ischämiezeit wurde die Reperfusion

eingeleitet. Jeweils 5h und 24h nach Ischämieinduktion wurde nach der klinisch-neurologischen Untersuchung inklusive Rotarod-Test eine MRT-Untersuchung durchgeführt. Die Tiere wurden dann in tiefer Isofluran-Narkose dekapitiert und der Wassergehalt der beiden Hemisphären mit Hilfe der Nass-Trocken-Methode bestimmt (Abb. 20).

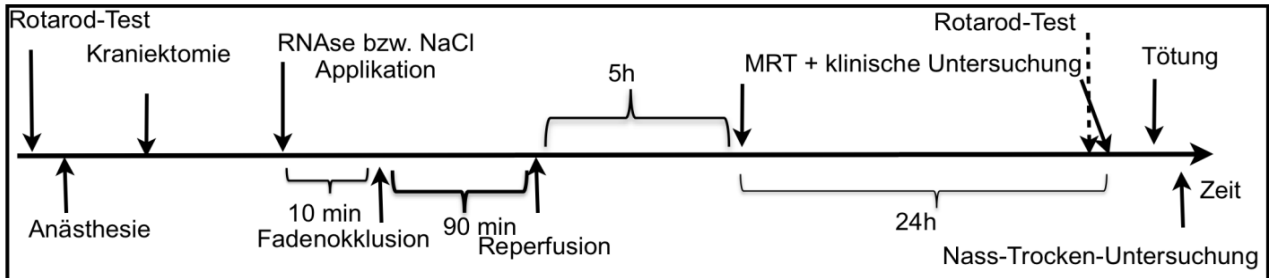


Abb.20: Studienablauf von Experiment V

III Ergebnisse

1. Experiment I: Etablierung der Kraniektomie im Tiermodell

Die Folgen der unilateralen Kraniektomie wurden 5h und 24h nach Infarktinduktion mit Hilfe der MRT-Bildgebung untersucht. Dabei konnte bei allen drei Versuchstieren sowohl nach fünf als auch nach 24 Stunden eine zerebrale Herniation im Bereich des Trepanationsdefekts nachgewiesen

M. Walberer, N. Ritschel, M. Nedelmann, K. Volk, C. Mueller, M. Tschernatsch, E. Stolz, F. Blaes, G. Bachmann, T. Gerriets.

Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection?

Journal of Neurosurgery 109:287-293, 2008.

werden. Auf den T2-gewichteten Sequenzen war der Infarkt nach fünf Stunden noch nicht gut sichtbar, während er nach 24 Stunden deutlich vom umliegenden Gewebe abgrenzbar war. Bei der MRT-Messung konnten im inkarzerierten Hirngewebe ebenfalls ischämische Areale detektiert werden (Abb. 21).

Nach Modifikation des Trepanationsverfahrens (bilaterale Kraniektomie) kam es zu keiner Herniation mehr. Auch wiesen diese Tiere deutlich geringere Mittellinienverlagerungen auf, was auf einen verbesserten Druckentlastungseffekt hindeutet (Abb. 22).

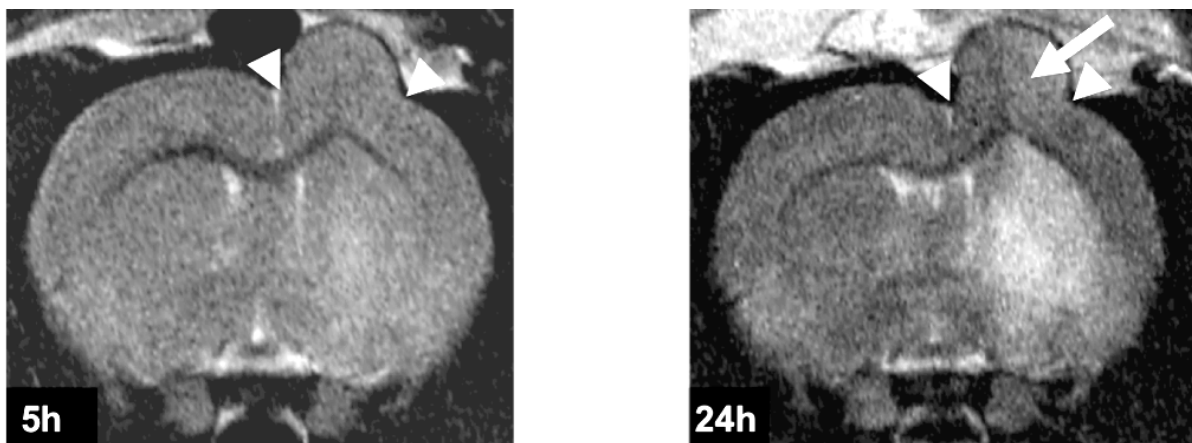


Abb. 21: Die T2-gewichteten MR-Aufnahmen zeigen die Auswirkungen einer unilateralen Hemikraniektomie (links 5h, rechts 24h nach Ischämieinduktion). Bereits nach 5 Stunden ist eine deutliche Herniation von Hirngewebe durch den Trepanationsdefekt zu erkennen. Die weißen Pfeilspitzen weisen auf die äußere Begrenzung des präparierten Knochenfensters im Schädel. Nach 24 Stunden zeigt sich zudem eine partielle Infarzierung des inkarzerierten Hirngewebes (großer Pfeil).

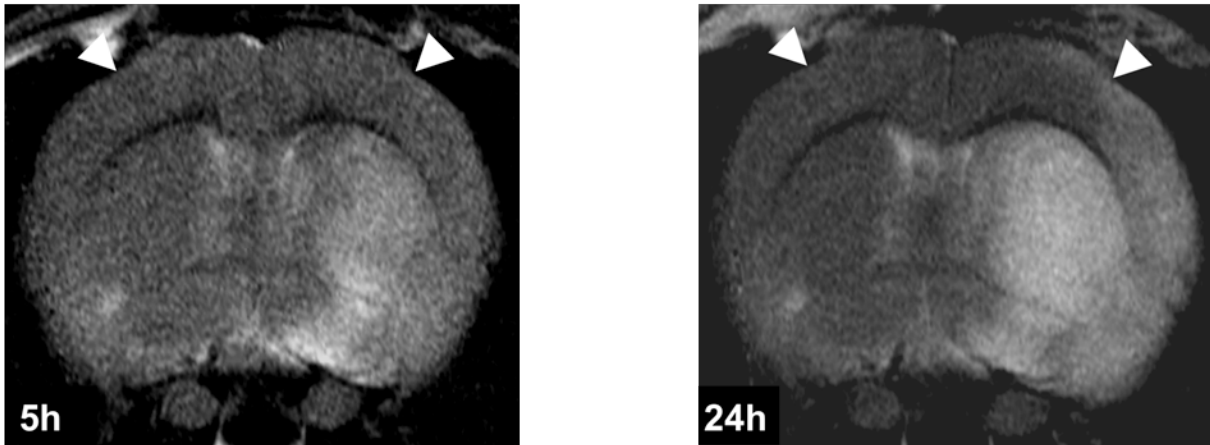


Abb. 22: T2-gewichtete MR-Aufnahmen, links 5h, rechts 24h nach Ischämieinduktion, bei bilateral kraniektomierten Tieren. Es findet sich kein Nachweis von inkarzeriertem Hirngewebe. Auch die Verlagerungen von Mittellinienstrukturen sind deutlich weniger ausgeprägt.

2. Experiment II: Einfluss der bilateralen Kraniektomie auf die kortikale Temperatur

Um die Auswirkungen der bilateralen Kraniektomie auf die kortikale Temperatur zu untersuchen, wurden über 120 Minuten sowohl die rektale als auch die kortikale Temperatur bei Tieren mit und ohne Kraniektomie gemessen.

Über den kompletten Messzeitraum von 120 Minuten waren innerhalb der Gruppen keine signifikanten Erhöhungen bzw. Erniedrigungen der Temperatur zu beobachten. In der Kraniektomiegruppe lag die rektale Temperatur durchschnittlich $0,6^{\circ}\text{C} \pm 0,06$ über der kortikalen Temperatur, während in der Kontrollgruppe die rektale Temperatur im Durchschnitt $0,75^{\circ}\text{C} \pm 0,071$ höher war als die zerebrale Temperatur ($p > 0,05$; t-test).

M. Walberer, N. Ritschel, M. Nedelmann, K. Volk, C. Mueller, M. Tschernatsch, E. Stolz, F. Blaes, G. Bachmann, T. Gerriets.

Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection?
Journal of Neurosurgery 109:287-293, 2008.

Während der zweistündigen Beobachtungszeit blieb die Temperaturdifferenz zwischen Kraniektomie-Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe von durchschnittlich $0,15^{\circ}\text{C}$ etwa konstant (Abb. 23).

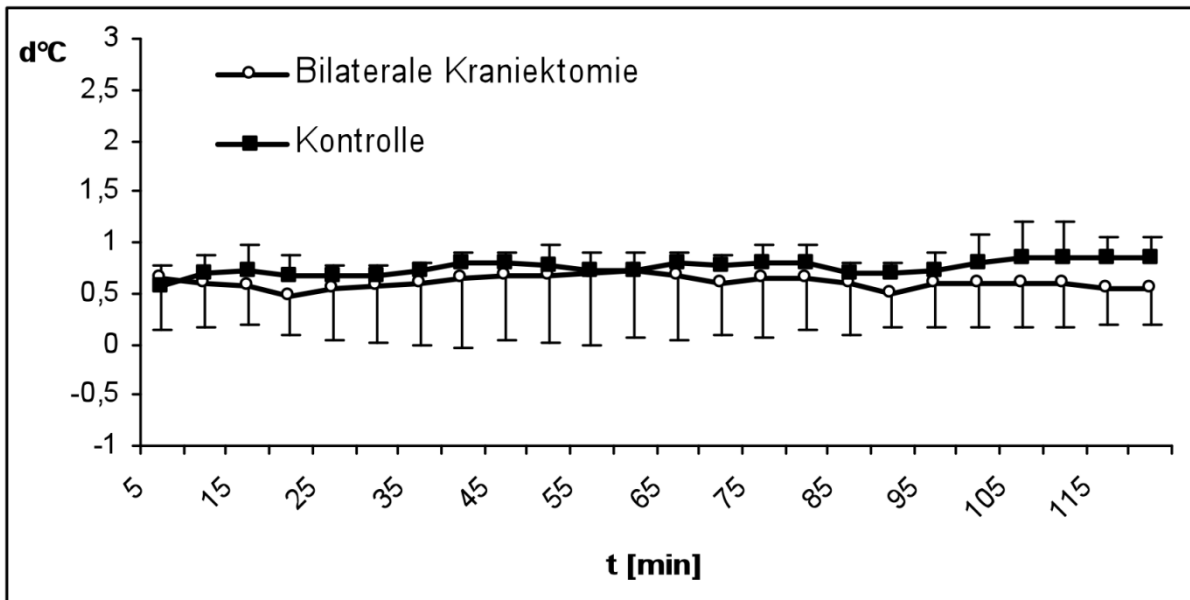


Abb. 23: Graphische Darstellung der Temperaturdifferenzen zwischen kortikaler und rektaler Temperatur über eine Beobachtungszeit von 120 Minuten in beiden Versuchsgruppen ($n=4$; Temperatur jeweils gemittelt, $p>0,05$).

3. Experiment III: Einfluss der Kraniektomie auf das Infarktvolumen

3.1 Ausgeschlossene Tiere

Im Rahmen dieser Studie mussten entsprechend der vordefinierten Kriterien insgesamt drei Tiere ausgeschlossen und ersetzt werden. Jeweils ein Versuchstier aus jeder Versuchsgruppe verstarb vor Beendigung des Studienprotokolls. Wegen eines klinisch

M. Walberer, N. Ritschel, M. Nedelmann, K. Volk, C. Mueller, M. Tschernatsch, E. Stolz, F. Blaes, G. Bachmann, T. Gerriets.

Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection?
Journal of Neurosurgery 109:287-293, 2008.

und MR-tomographisch nicht nachweisbaren Infarkts musste ein weiteres Tier aus der Kraniektomie-Behandlungsgruppe ausgeschlossen werden.

3.2 Klinisch-neurologische Befunde

In der klinisch-neurologischen Untersuchung nach fünf und 24 Stunden zeigte sich bei den kraniektomierten Versuchstieren ein signifikant besseres Outcome im Neuroscore ($1,67 \pm 0,49$) als bei Tiere der Vergleichsgruppe ohne Kraniektomie ($2,0 \pm 0,0$; $p<0,05$; U-Test) (Abb. 24).

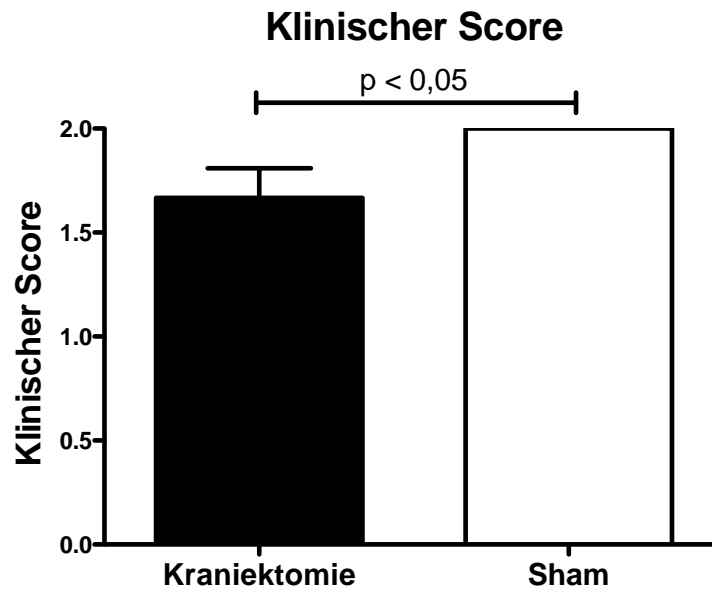


Abb. 24: Balkendiagramm zur klinisch-neurologischen Untersuchung nach 5h und 24h. Ein erhöhter Score zeigt eine höhergradige neurologische Beeinträchtigung der Tiere an.

3.3 Ischämisches Läsionsvolumen

Die Hirninfarkte waren in der T2-gewichteten Bildgebung fünf und 24 Stunden nach Ischämieinduktion in beiden Gruppen deutlich sichtbar und umfassten typischerweise kortikale und subkortikale Anteile des A. cerebri media-Versorgungsgebietes.

In der Hemikraniektomie-Gruppe ergab sich nach fünf Stunden ein Läsionsvolumen von $12,8\% \pm 11,3$ und nach 24h von $25,4\% \pm 12,6$. Bei den nicht-kraniektomierten Tieren (sham-operierte Tiere) wurde ein Läsionsvolumen von $34,0\% \pm 10,8$ nach fünf Stunden und von $57,9\% \pm 13,0$ nach 24 Stunden ermittelt. Die Tiere, die der bilateralen Kraniektomie unterzogen wurden, zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowohl fünf als auch 24 Stunden nach Infarktinduktion (p jeweils $<0,0001$) ein drastisch kleines Läsionsvolumen (Abb. 25).

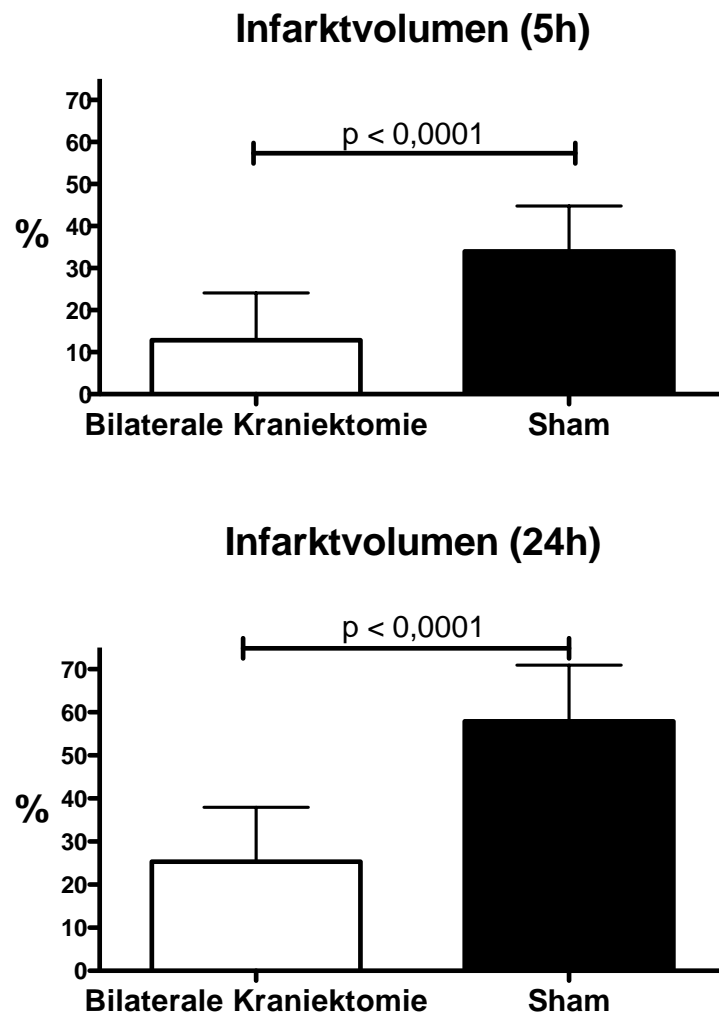


Abb. 25: Darstellung der Läsionsvolumina der beiden Behandlungsgruppen nach 5h und 24h. Die Hemikraniektomie führte zu beiden Zeitpunkten zu einer drastischen Reduktion des Läsionsvolumens (p jeweils $<0,0001$).

3.4 Mittellinienverlagerung

Die Mittellinienverlagerung betrug fünf Stunden nach Infarktinduktion in der Gruppe der bilateralen Kraniektomie $0,31\text{mm} \pm 0,13$ und in der Gruppe der sham-operierten Tiere $0,37\text{mm} \pm 0,08$. Ein statistischer Vergleich der Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$; t-test). Hingegen konnte nach 24h ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, da sich die Mittellinienstrukturen in der sham-operierten Gruppe ($1,11\text{mm} \pm 0,37$) deutlicher verlagerten als in der Gruppe der hemikraniektomierten Versuchstiere ($0,62\text{mm} \pm 0,37$) ($p < 0,001$, t-test) (Abb. 26).

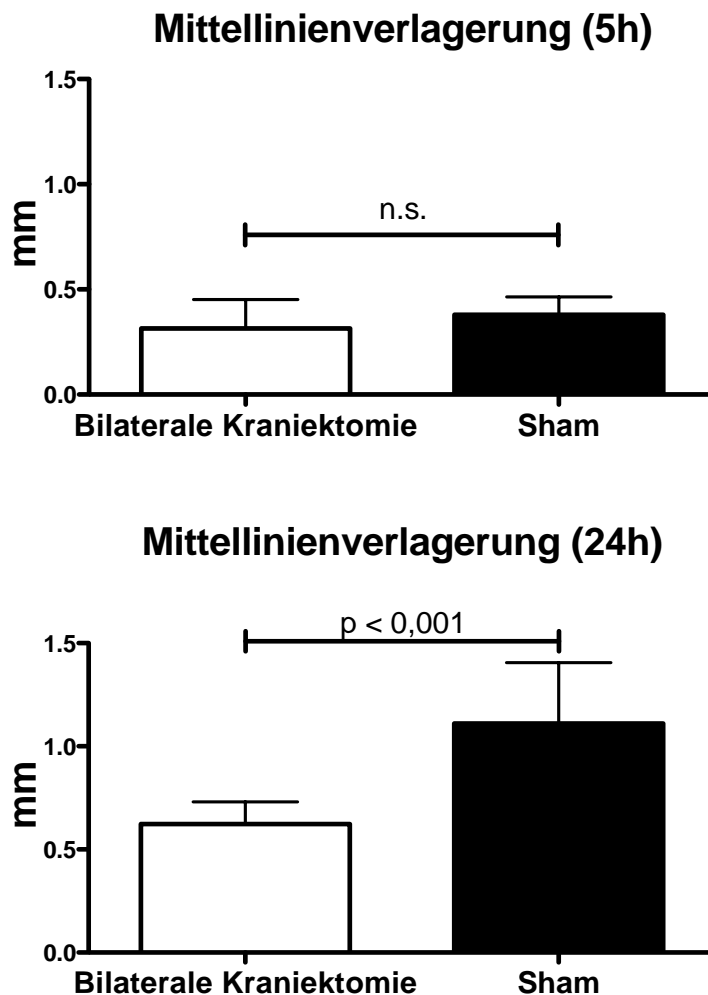


Abb. 26: Darstellung der Mittellinienverlagerung der Kraniektomie- und Sham-OP-Behandlungsgruppe

3.5 T2-Relaxationszeit

Hinsichtlich der T2-Relaxationszeit in den "Regions-of-Interest" konnten radiologisch keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden. Nach der Kraniektomie ergaben sich nach fünf Stunden Werte von $12,45 \pm 5,16$ und nach 24h von $29,60 \pm 6,78$. In der Gruppe der sham-operierten Ratten konnte nach fünf Stunden ein Wert von $12,96 \pm 2,03$ und ein 24h-Wert von $35,16 \pm 8,98$ ermittelt werden. Im Vergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, t-test) (Abb. 27; Abb. 28).

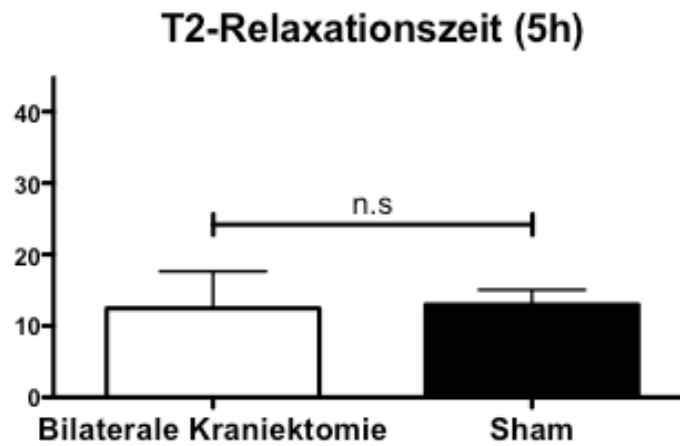


Abb. 27: T2-Relaxationszeit 5h nach Infarkt-induktion. Zwischen den beiden Gruppen war keine signifikante Differenz der T2-Relaxationszeit feststellbar, was auf eine gleiche Ausprägung des vasogenen Hirnödems in den "regions of interest" hindeutet.

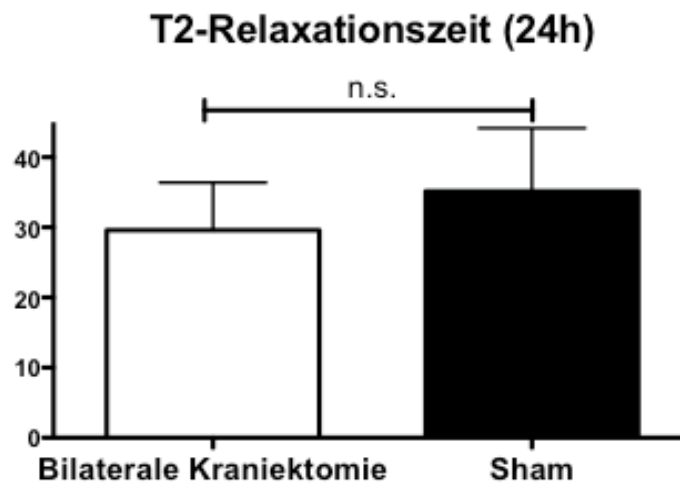


Abb. 28: T2-Relaxationszeit 24h nach Infarkt-Induktion. Auch zu diesem Zeitpunkt ergab sich in den "regions of interest" kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.6 T2*-gewichtete Bildgebung

Die T2*-gewichtete MR-Bildgebung, welche die Detektion von intra- und extrazerebralen Blutungen ermöglicht, zeigte bei keinem Versuchstier einen Hinweis auf eine hämorrhagische Komplikation.

3.7 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts

Der Gewebewassergehalt der ischämischen Hemisphäre, der postmortal durch die Nass-Trockenmethode bestimmt wurde, zeigte eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$, t-test) bei Tieren der Hemikraniektomie-Behandlungsgruppe ($1,03 \pm 2,07$) im Vergleich mit sham-operierten Tieren ($3,28 \pm 1,31$) (Abb. 29).

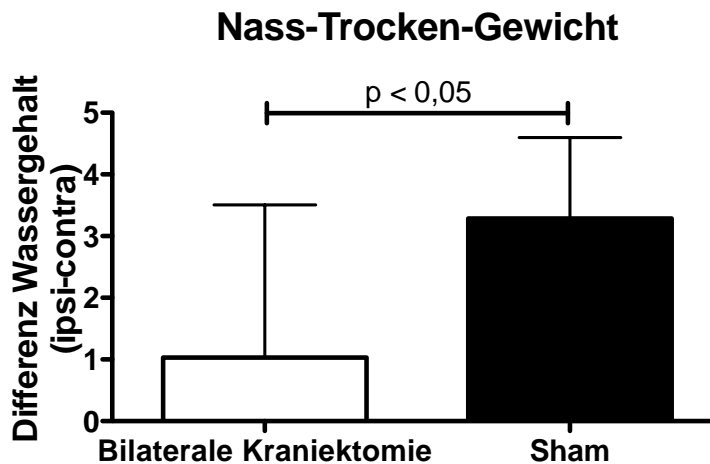


Abb. 29: Signifikante Reduktion des Gewebewassergehalts der ischämischen Hemisphäre durch die Kraniektomie ($p < 0,05$).

4. Experiment IV: Neuroprotektive Wirkung von RNase

4.1 Ausgeschlossene Tiere

Gemäß der vordefinierten Kriterien mussten acht von insgesamt 34 Tieren (23,5%) von dieser Studie ausgeschlossen und substituiert werden. Drei Tiere der Placebo-Gruppe starben noch vor Beendigung des Studienprotokolls. Zwei weitere Tiere der Placebogruppe sowie zwei Ratten der RNase-Behandlungsgruppe mussten wegen eines fehlenden Infarkts ausgeschlossen werden. Ein Tier der RNase-

M. Walberer, M. Tschernatsch, S. Fischer, N. Ritschel, K. Volk, C. Friedrich, G. Bachmann, C. Mueller, M. Kaps, M. Nedelmann, F. Blaes, K. Preissner, T. Gerriets.

RNase Therapy assessed by Magnetic Resonance Imaging reduces cerebral Edema and Infarction Size in Acute Stroke

Current Neurovascular Research 6,12-19, 2009.

Gruppe musste aufgrund einer fehlenden Reperfusion ausgeschlossen werden, da abgelöste Fragmente der Silikonbeschichtung des Fadens, die bei der postmortalen Inspektion aufgefunden wurden, zu einem permanenten Verschluss der A. cerebri media geführt hatten.

4.2 Klinisch-neurologische Untersuchung

Die klinisch-neurologische Untersuchung wurde 70 min, 5h und 24h nach Infarktinduktion durchgeführt. Hierbei ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen beiden Gruppen nachweisen ($p > 0,05$, U-Test) (Abb. 30).

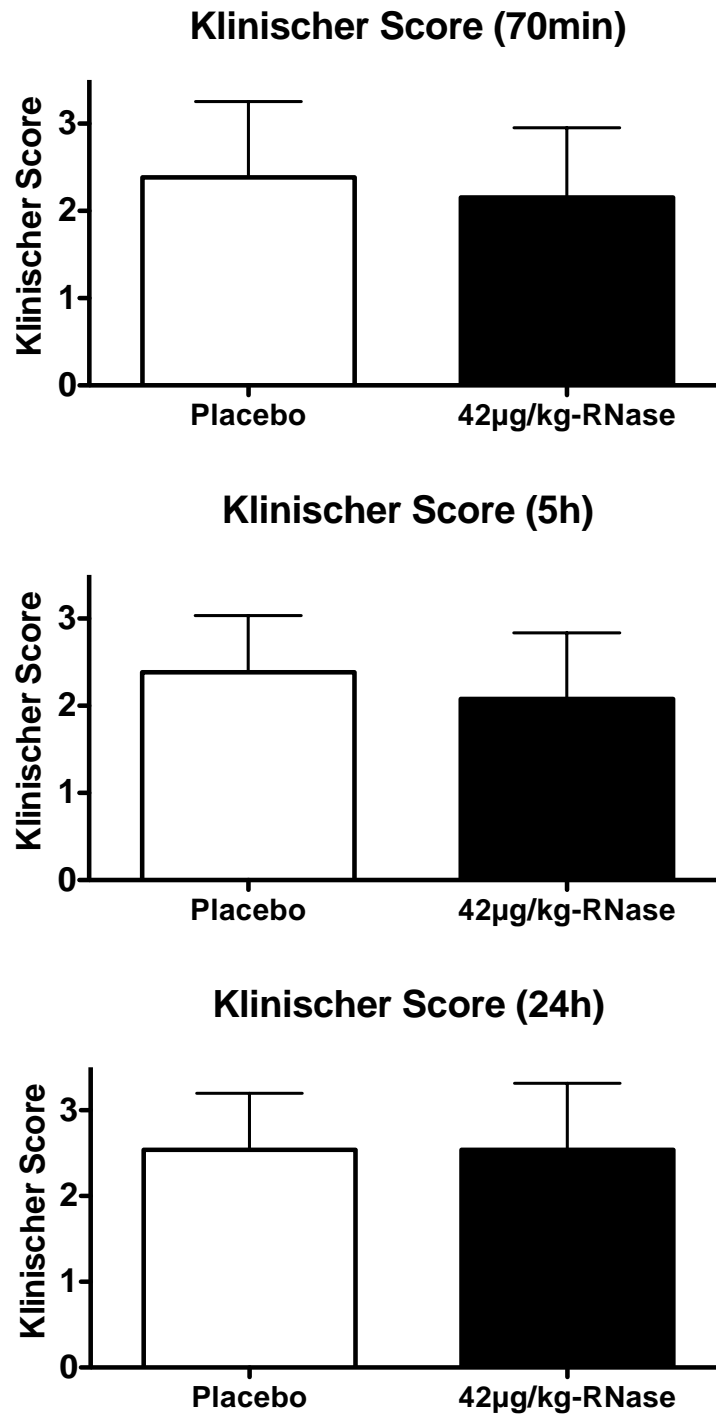


Abb. 30: Graphischer Darstellung der klinisch-neurologischen Beurteilung 70 min, 5h und 24h nach Infarktinduktion. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

4.3 Ischämisches Läsionsvolumen

In der T2-gewichteten MR-Bildgebung konnte 5h nach Infarktinduktion eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens in der 42µg/kg RNase-Gruppe (13,0% ± 6,1) im Vergleich zur Placebogruppe (27,7% ± 10,3) festgestellt werden ($p < 0,01$; t-test) (Abb. 31).

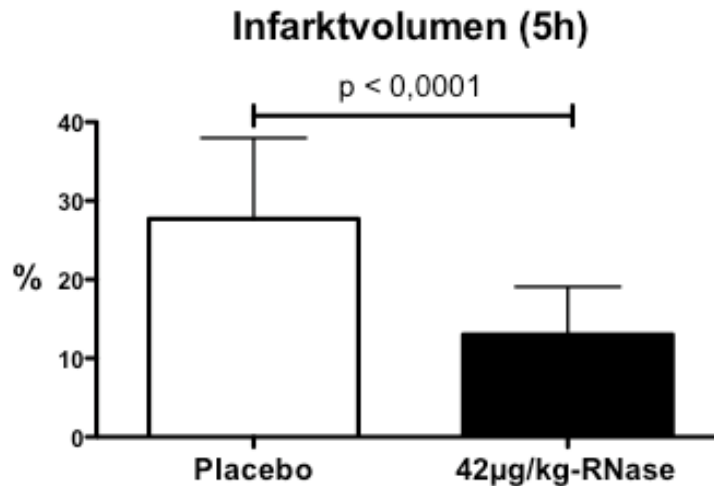


Abb. 31: Ischämischen Läsionsvolumens nach 5h. Die Behandlung mit RNase führte zu einer signifikanten Reduktion des Läsionsvolumens ($p < 0,01$; t-test).

Die ischämischen Läsionsvolumenina der RNase-Gruppe (26,7% ± 10,7) zeigten nach 24 Stunden im Vergleich zur Placebogruppe (41,0% ± 10,3) ebenfalls eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$; t-test) (Abb. 32).

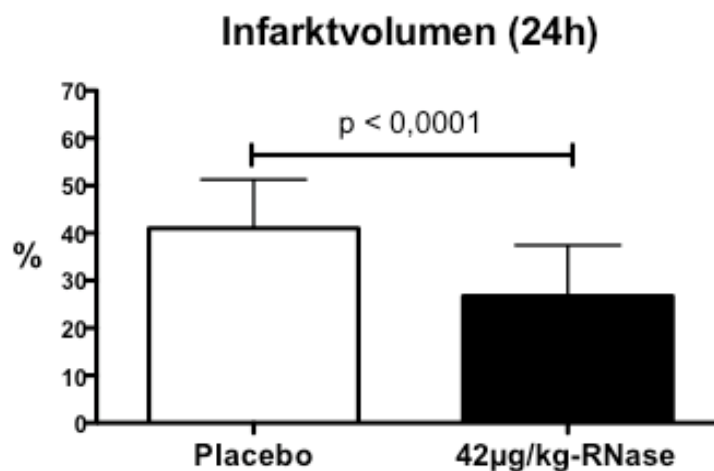


Abb. 32: Darstellung des Infarkt volumens 24h nach Infarkt-Induktion. Die Behandlung mit RNase reduzierte das Läsionsvolumen deutlich ($p < 0,05$).

4.4 Mittellinienverlagerung

Die Messung der Mittellinienverlagerung ergab 5h nach Infarktinduktion in der Placebogruppe eine Verlagerung von $0,37\text{mm} \pm 0,11\text{mm}$, wobei in der Gruppe unter RNase eine Verschiebung des dritten Ventrikels von $0,27\text{mm} \pm 0,16\text{mm}$ festgestellt werden konnte ($p > 0,05$).

Nach 24h zeigte die Mittellinie in der Placebogruppe eine Verlagerung von $1,09\text{mm} \pm 0,29\text{mm}$, wohingegen sich die Mittellinie der RNase-Gruppe signifikant geringer verlagerte ($0,69\text{mm} \pm 0,41\text{mm}$; $p < 0,05$; t-test) (Abb. 33).

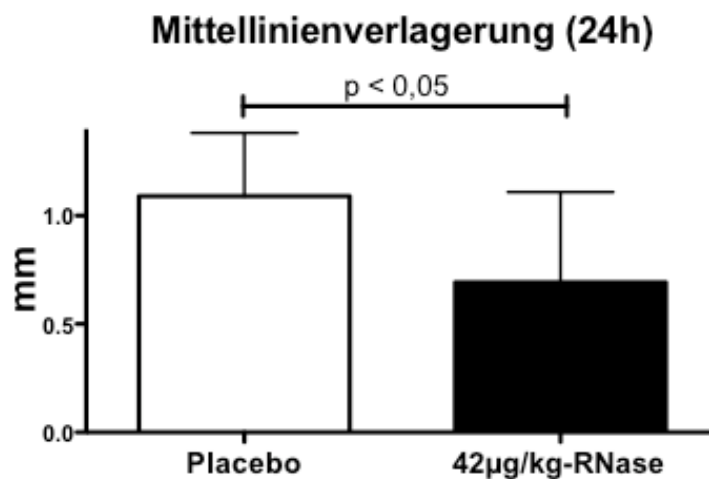


Abb. 33: 24h nach Infarktinduktion lag bei den RNase-behandelten Tieren eine signifikant geringere Mittellinienverlagerung vor.

4.5 T2-Relaxationszeit

Während sich die T2-Relaxationszeiten zwischen den Gruppen nach fünf Stunden nicht signifikant unterschieden (Placebo: $12,38 \pm 3,6$; RNase: $7,76 \pm 4,31$; $p > 0,05$), zeigte sich nach 24h eine signifikant verlängerte T2-Relaxationszeit in der Placebogruppe ($41,84 \pm 11,78$) im Vergleich zur RNase-Gruppe ($30,76 \pm 13,07$; $p < 0,05$; t-test) (Abb. 34).

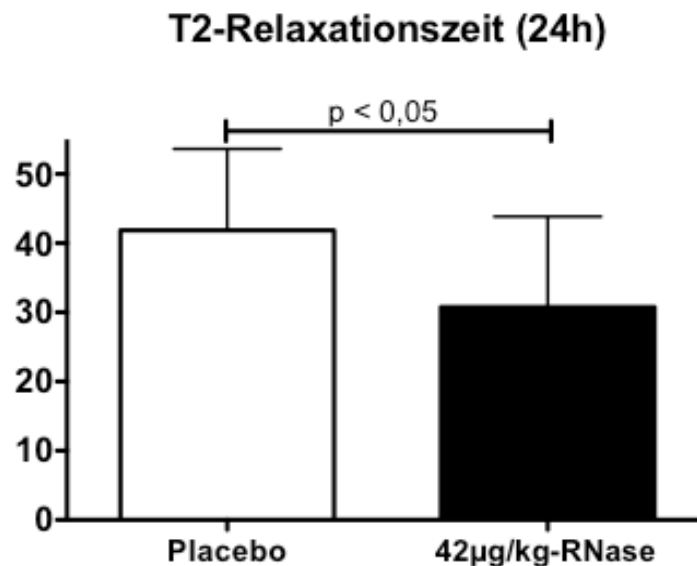


Abb. 34: 24h nach Infarktinduktion war bei behandelten Tiere eine signifikante Reduktion der T2-Relaxationszeit erkennbar, was auf eine Verminderung des vasogenen Hirnödems hindeutet.

4.6 T2*-gewichtete Bildgebung

Bei keinem Tier konnte mittels T2*-gewichteten MR-Aufnahmen eine intrazerebrale Blutung detektiert werden. Dieser Befund deckte sich mit den Ergebnissen der postmortalen Inspektion.

4.7 Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts

Zur Bestimmung des zerebralen Wassergehalts diente die Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichts. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion des zerebralen Wassergehalts der ischämischen Hemisphäre in der RNase-Gruppe ($0,3 \pm 3,7$) im Vergleich zur Placebogruppe ($3,2 \pm 1,3$; $p < 0,05$; t-test) ($\% \Delta H_2O$) (Abb. 35).

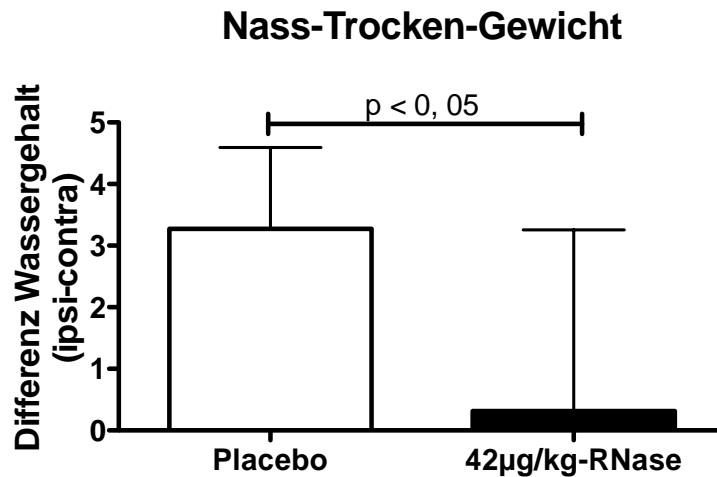


Abb. 35: Die Behandlung mit RNase führte - im Vergleich mit Placebo- zu einer signifikanten Reduktion des Wassergehalts der infarzierten Großhirnhemisphäre.

5. Experiment V: Wirkung von RNase bei kraniektomierten Tieren

5.1 Ausgeschlossene Tiere

In diesem Experiment mussten gemäß der Kriterien des Studienprotokolls insgesamt sieben von 29 Versuchstieren ausgeschlossen und ersetzt werden. Zwei Tiere pro Gruppe zeigten weder klinisch noch im MRT einen Hinweis auf eine Ischämie. Zwei Ratten der Placebogruppe verstarben vor Beendigung der Studie und ein Tier der RNase-Gruppe erlitt eine subarachnoidale Blutung (erkennbar postmortal und in der T2*-Bildgebung).

M. Walberer, M. Tschernatsch, S. Fischer, N. Ritschel, K. Volk, C. Friedrich, G. Bachmann, C. Mueller, M. Kaps, M. Nedelmann, F. Blaes, K. Preissner, T. Gerriets.
RNase Therapy assessed by Magnetic Resonance Imaging reduces cerebral Edema and Infarction Size in Acute Stroke
 Current Neurovascular Research 6,12-19, 2009.

5.2 Klinisch-neurologische Untersuchung

Der durchgeführte Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich des klinisch-neurologischen Status. RNase-behandelte Tiere zeigten nach fünf Stunden einen Neuroscore von $2,3 \pm 0,85$, nach 24h betrug dieser $2,69 \pm 0,75$. Hingegen konnte bei Tieren der RNase-Gruppe nach fünf Stunden ein

Neuroscore von $2,53 \pm 0,26$ ermittelt werden. Nach 24h zeigten diese Tiere einen Wert von $2,53 \pm 1,05$. Im Vergleich der beiden Behandlungsgruppen konnte somit zu beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

5.3 Rotarod-Test

Der Rotarod-Test konnte darstellen, dass RNase-behandelte Tiere signifikant besser abschnitten als Ratten der Placebogruppe. Vor Applikation der Substanzen (Baseline) absolvierten Ratten, die der Placebogruppe angehörten, durchschnittlich 23,1 rpm (Runden pro Minute) $\pm 7,2$ und die Tiere der RNase-Gruppe $22,2 \text{ rpm} \pm 6,4$. Die Baseline-Messung zeigte somit keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$, t-test). Nach 24h absolvierten placebobehandelte Versuchstiere $6,9 \text{ rpm} \pm 8,1$, während Tiere der RNase-Behandlungsgruppe $14,8 \text{ rpm} \pm 9,0$ leisteten. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,05$; t-test) (Abb. 36.).

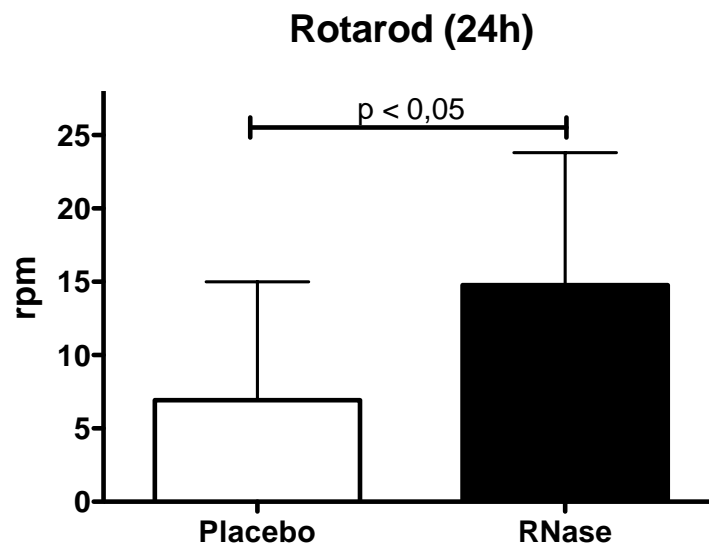


Abb. 36: Rotarod-Test bei hemikraniektomierten Versuchstieren. RNase-behandelte Ratten zeigten eine signifikant verbesserte Leistung als die Placebogruppe 24h nach Infarktinduktion ($14,8 \text{ rpm}$ vs. $6,9 \text{ rpm}$; $p < 0,05$) (rpm=Runden pro Minute).

5.4 Ischämisches Läsionsvolumen

In der Kernspintomographie zeigten die postischämischen Läsionsvolumina beider Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$, t-test). Das ischämische Areal der RNase-behandelten Tiere wurde nach fünf Stunden mit $10,2 \% \pm 5,9$ und nach

24h mit $24,4\% \pm 13,1$ bestimmt. Demgegenüber standen vergleichbare Läsionsvolumina der Placebogruppe von $13,8\% \pm 11,5$ nach 5h und von $27,8\% \pm 15,0$ nach 24 Stunden (Abb. 37).

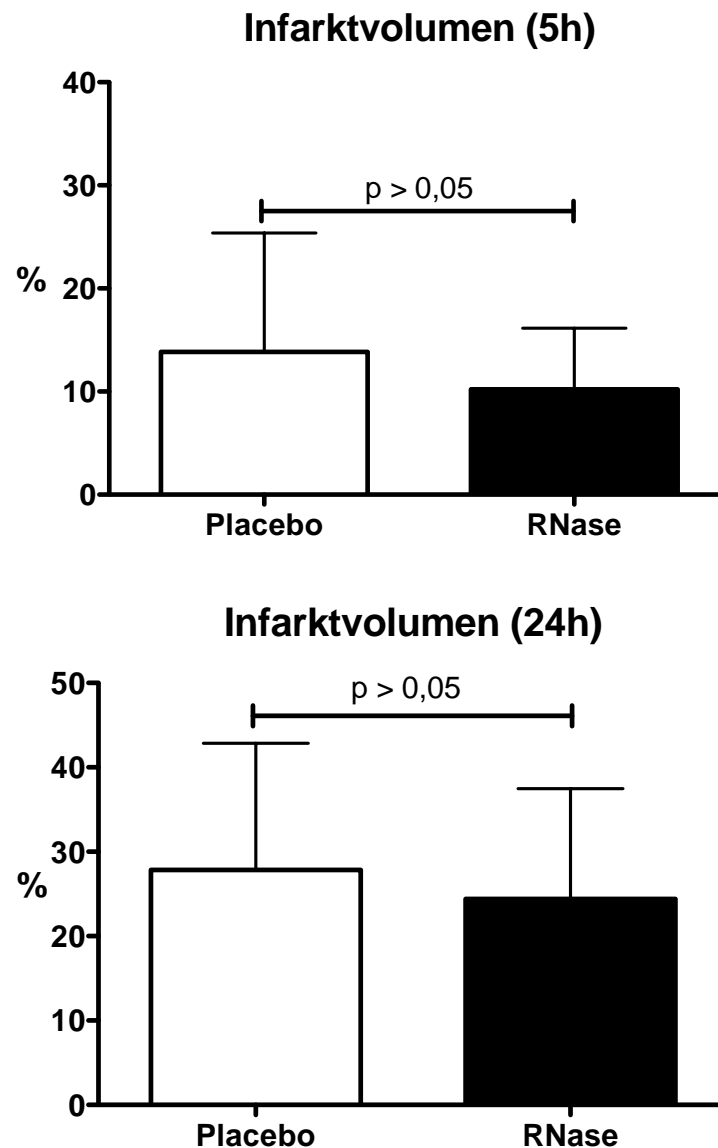


Abb. 37: Durch RNase konnte bei krani-ektomierten Versuchstieren keine signifikante Reduktion der Läsionsvolumina erreicht werden ($p > 0,05$).

5.5 Mittellinienverlagerung

Die Mittellinienverlagerung zeigte fünf Stunden und 24h nach Infarktinduktion keine signifikanten Unterschiede zwischen der RNase-Gruppe (5h: $0,30\text{mm} \pm 0,22\text{mm}$; 24h: $0,6\text{mm} \pm 0,40\text{mm}$) und der Placebogruppe (5h: $0,36\text{mm} \pm 0,22$; 24h: $0,7\text{mm} \pm 0,45\text{mm}$; $p > 0,05$, t-test).

5.6 T2-Relaxationszeit

Bei der Messung der T2-Relaxationszeiten in den „Regions-of-Interest“ konnte festgestellt werden, dass sowohl 5h, als auch 24h nach Infarktinduktion eine signifikant reduzierte T2-Relaxationszeit nach RNase-Behandlung (5h: $8,92 \pm 5,99$; 24h: $26,5 \pm 10,33$) im Vergleich zu der Placebogruppe (5h: $14,8 \pm 7,98$; 24h: $35,69 \pm 12,25$; $p < 0,05$, t-test) besteht (Abb.38).

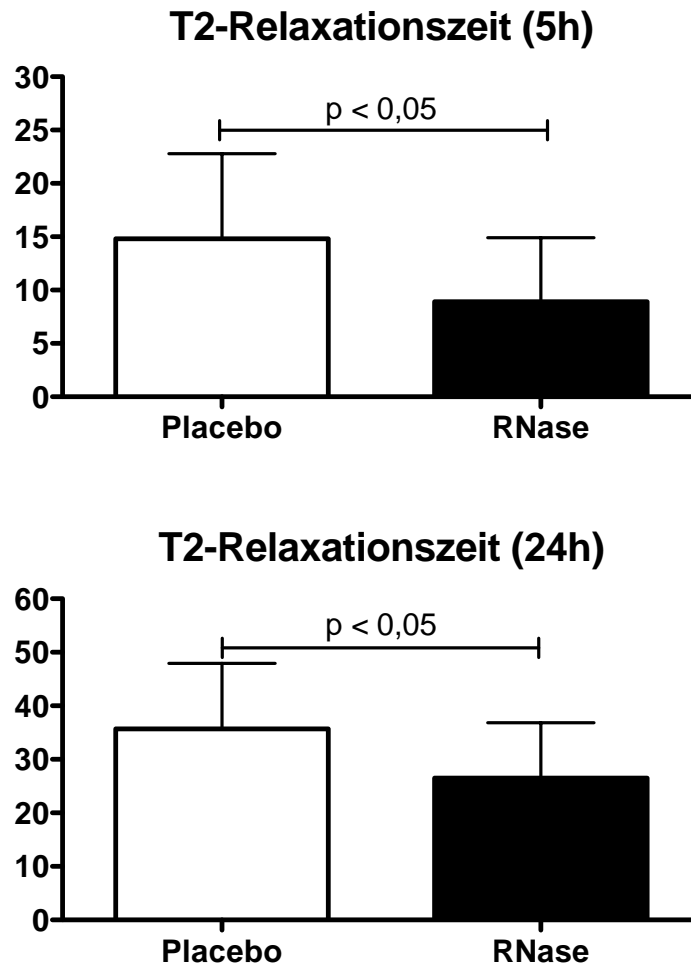


Abb. 38: Bestimmung der T2-Relaxationszeiten. Die RNase-Behandlung führte sowohl 5h als auch 24h nach Ischämieinduktion zu einer signifikant reduzierten T2-Relaxationszeit ($p < 0,05$), was die ödemreduzierende Wirkung der Substanz auch bei kraniektomierten Tieren belegt.

5.7 T2*-gewichtete Bildgebung

Entsprechend dem Studienprotokoll wurden alle Tiere auf das Vorhandensein einer intrazerebralen Blutung kontrolliert. In der kernspintomographischen Begutachtung

konnten mittels T2*-gewichteter Sequenzen keine hämorrhagischen Komplikationen nachgewiesen werden.

5.8 Bestimmung des Nass-Trockengewichts

In der Placebogruppe betrug der mit der Nass-Trocken-Methode ermittelte Wassergehalt $1,3 \pm 2,5$, während die Gruppe, die mit RNase behandelt wurde, einen signifikant geringeren Wassergehalt von $-0,4 \pm 1,4$ aufwies ($p < 0,05$; t-test) ($\% \Delta H_2O$) (Abb. 39).

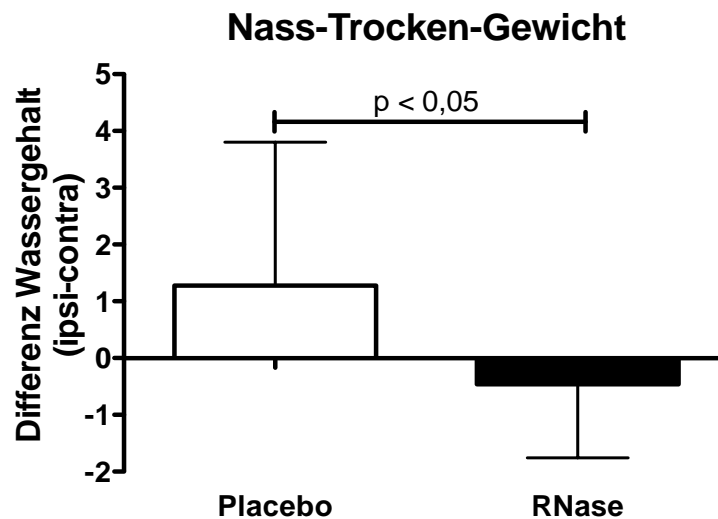


Abb. 39: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der Nass-Trocken-Untersuchung zur Quantifizierung des zerebralen Wassergehalts. Bei den Versuchstieren mit RNase-Behandlung konnte eine signifikante Reduktion des Wassergehalts nachgewiesen werden.

6. Einfluss des Raumforderungseffekts auf die neuroprotektive Wirkung von RNase (Gegenüberstellung von Experiment IV und V)

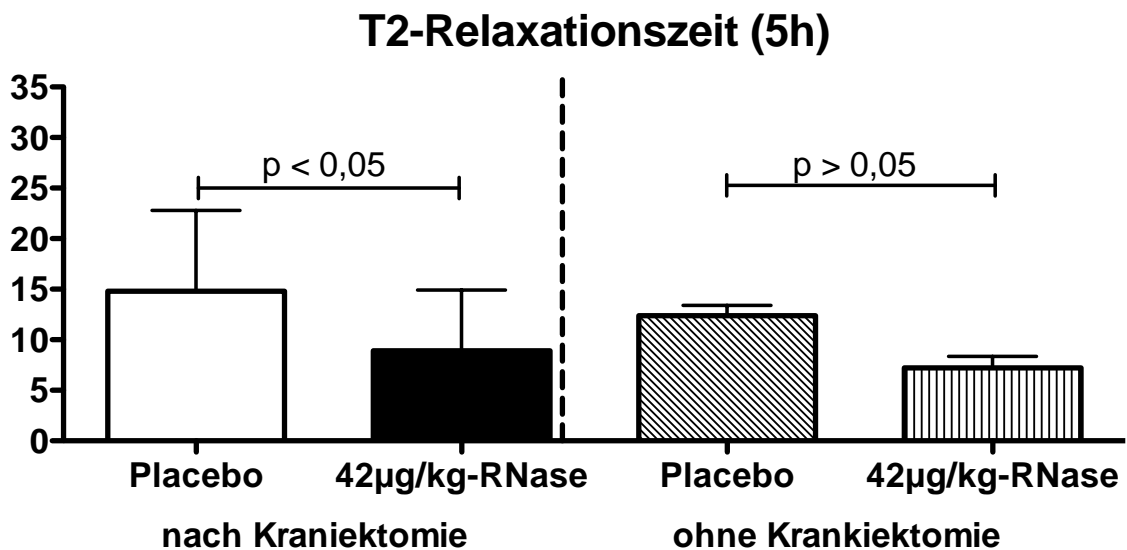


Abb. 40: 5h nach Infarktinduktion zeigt sich eine signifikante Reduktion der T2-Relaxationszeit bei kraniektomierten Tieren, welche mit RNase behandelt wurden. (siehe 5.6). Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied bei nicht-kraniektomierten Versuchstieren festgestellt werden unabhängig von der RNase-Behandlung (rechtes Diagramm).

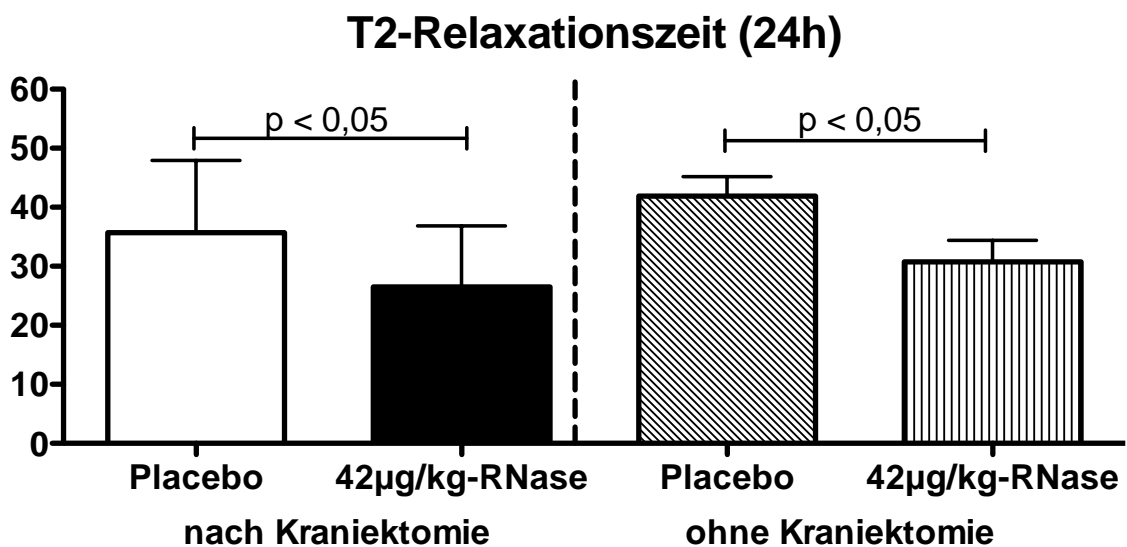


Abb. 41: Hingegen konnte nach 24h in beiden Versuchsarmen durch RNase-Behandlung eine signifikante Reduktion der T2-Relaxationszeiten erzielt werden, was als Zeichen einer Verminderung des vasogenen Hirnödems interpretiert werden muss (siehe Versuch 4.5 und 5.6).

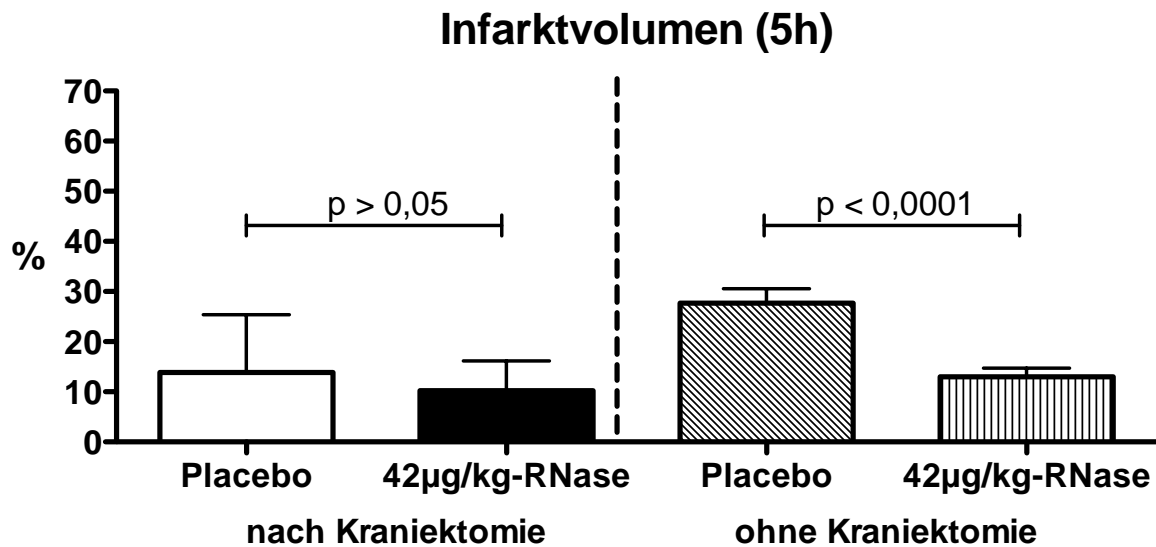


Abb. 42: Darstellung des mittleren Läsionsvolumens in % der Hemisphäre 5h nach Infarktinduktion. Keine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens zwischen den kraniektomierten Versuchstieren der Placebo- (13,8 % ± 11,5 %) und RNase-Gruppe (10,2 % ± 5,9%; $p > 0,05$.) Rechts im Diagramm sind zum Vergleich nochmals die aus Experiment IV gewonnenen Läsionsvolumina der Placebo- und RNase-Gruppe ohne Kraniektomiebehandlung abgebildet. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens unter RNase-Applikation ($p < 0,0001$).

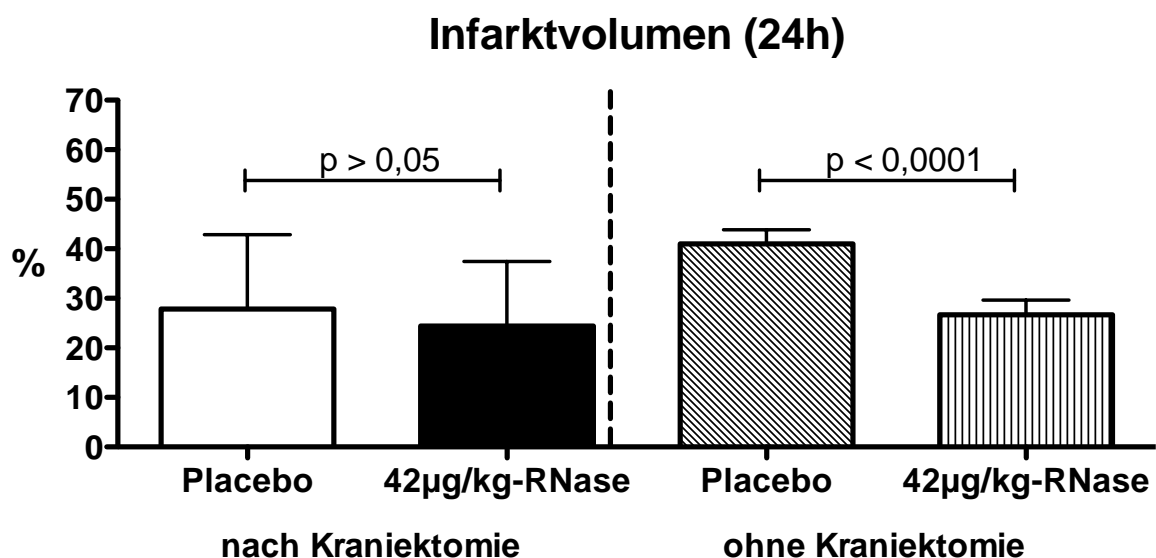


Abb. 43: 24h nach Infarktinduktion und Kraniektomie konnte in diesem Experiment kein signifikanter Unterschied in den mittleren Läsionsvolumina zwischen der Placebo (27,8 % ± 15,0 %)- und der RNase-Gruppe (24,4 % ± 13,1 %) festgestellt werden. Rechts zum Vergleich erneut die Ergebnisse der zwei nicht-operierten Versuchsgruppen (Placebo und RNase) aus Experiment IV (siehe 4.3), die eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens unter RNase nachweisen konnten.

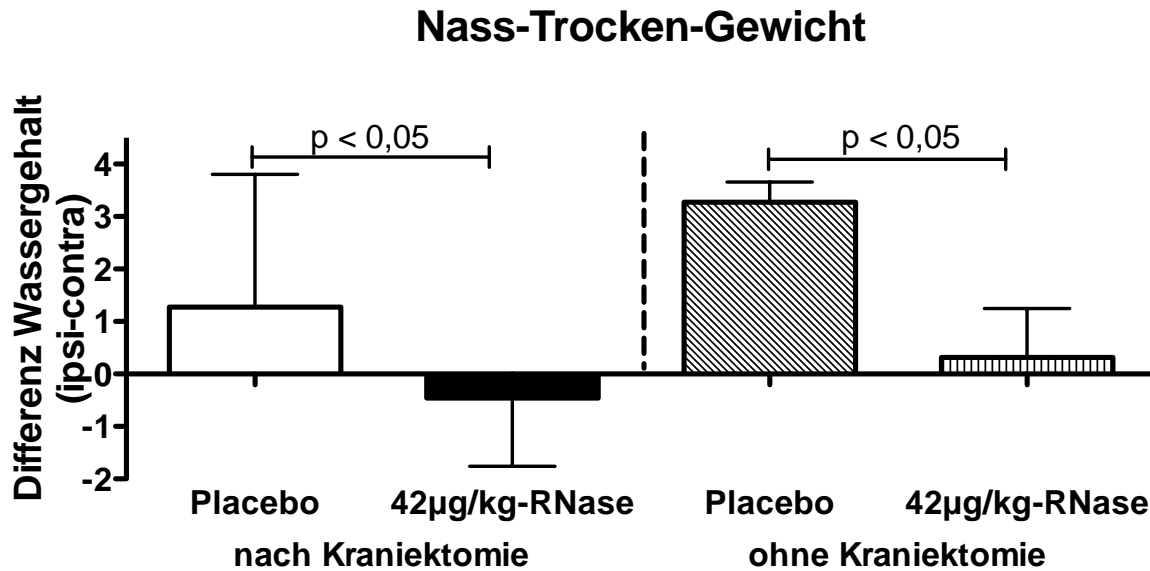


Abb. 44: Graphische Darstellung des Gehirn-Wassergehalts. Die linken Balkendiagramme stellen den zerebralen Wassergehalt bei kraniektomierten Tieren dar. Hierbei zeigt sich, dass durch die Behandlung von RNase im Vergleich zur Placebogruppe eine signifikante Reduktion des Wassergehalts möglich ist ($p < 0,05$) (siehe 5.8). Ebenfalls bewirkt die Behandlung von RNase bei nicht-kraniektomierten Versuchstieren eine signifikante Verminderung des zerebralen Wassergehalts ($p < 0,05$), was den Balkendiagrammen rechts zu entnehmen ist (siehe 4.7)

Zusammenfassung

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse von Experiment 4 und 5 wird deutlich, dass RNase bei kraniektomierten Versuchstieren keine signifikante Reduktion der Läsionsvolumina bewirkt. Bei nicht-kraniektomierten Tieren führt die Behandlung mit RNase hingegen zu einer signifikanten Verminderung des Infarkt volumens.

RNase wirkt in beiden Gruppen ödemreduzierend, was anhand der Reduktion der T2-Relaxationszeiten und des zerebralen Wassergehalts belegt werden konnte. Der neuroprotektive Effekt von RNase muss daher auf der Verminderung des raumfordernden Wirkung des vasogenen Hirnödems beruhen.

IV Diskussion

1. Der Schlaganfall

Der Schlaganfall ist nach der koronaren Herzerkrankung die am häufigsten zum Tode führende Erkrankung in westlichen Industrienationen (Murray et al. 1997; Mathers et al. 2009; Heuschmann et al. 2011). Im Jahre 2006 verstarben in der Bundesrepublik Deutschland 65133 Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls (Statisches Bundesamt 2008, Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008). Wegen des hohen Anteils an bleibenden Behinderungen bei Überlebenden ist die sozioökonomische Bedeutung dieser Erkrankung außerordentlich hoch (Paciaroni et al. 2000; Kucinski et al. 2005). So werden beispielsweise in den Vereinigten Staaten von Amerika etwa 67 Milliarden US-Dollar für die Versorgung von Schlaganfallpatienten aufgebracht (Rosamond et al. 2007). Angesichts des demographischen Wandels, gleichbleibende Inzidenzraten vorausgesetzt, muss beispielsweise in Hessen damit gerechnet werden, dass die Gesamtzahl aller behandelten Schlaganfälle von 20846 (2005) auf über 35000 im Jahr 2050 ansteigen wird (Foerch et al. 2008).

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Arten eines Schlaganfalls unterschieden: Fokale zerebrale Ischämien kommen mit 85% am häufigsten vor und beruhen überwiegend auf dem thrombotischen oder embolischen Verschluss von Hirnarterien. Die übrigen Fälle verteilen sich auf die unterschiedlichen Formen intrakranieller Hämorrhagien, wie intrazerebrale, subarachnoidale, epi- und subdurale Blutungen (Hamann 1997; De Freitags et al. 2003; Yamada et al. 2006).

Der Kenntnisstand über die Pathophysiologie fokaler zerebraler Ischämien ist in den vergangenen 40 Jahren erheblich gewachsen. Bemerkenswert ist der erhebliche Durchblutungsbedarf des Gehirns. Das Organ macht zwar lediglich 2% der Körpermasse des Menschen aus, benötigt jedoch rund 20% des Herzzeitvolumens, um den enormen Sauerstoff- und Energiebedarf zu decken. Es existieren nur unzureichend zerebrale Kompensationsmechanismen, wie beispielsweise eine zerebrovaskuläre Reservekapazität oder eine steigerbare Sauerstoffausschöpfung aus dem Blut, um schwerwiegende zerebrale Minderperfusionen effektiv auszugleichen (Siesjö 1984; Safar 1993). Daher ist das Hirngewebe in besonderer Weise von einer kontinuierlichen Substratversorgung abhängig. Der thrombotische oder embolische Verschluss einer Hirnarterie führt daher zu einer kritischen Reduktion der zerebralen Durchblutung (CBF) im entsprechenden arteriellen Stromgebiet. Bei einem CBF-Abfall von 40% (Normwerte: 0,5 ml Blut/g

Hirngewebe/ min) kommt es zum funktionellen Ausfall von Nervenzellen. Sinkt der zerebrale Blutfluss auf unter 20% des Normwertes ab, führt dies zum Zusammenbruch des Membranpotentials. Hält der Zustand der Minderperfusion auf diesem Niveau längere Zeit an, kommt es zu irreversiblen Zellschädigungen (Kaplan et al. 1991; Ginsberg et al. 1994; Hossmann 1994).

Die beschriebenen Abläufe sind bei länger andauernder, schwerer Ischämie grundsätzlich irreversibel und führen zu einem raschen Zelluntergang im Zentrum des betroffenen Areals, dem sogenannten Infarktkern. Um dieses Zentrum herum befindet sich jedoch eine ausgedehnte Randzone mit verminderter Perfusion, deren Restdurchblutung über leptomenigeale Kollateralkreisläufe gewährleistet wird. Hierbei handelt es sich beispielsweise um oberflächliche Anastomosen zwischen Ästen der A. cerebri anterior, media und posterior (Weidner et al. 1965; Liebeskind 2003). Die Funktion der Nervenzellen in der Penumbra ist erheblich gestört, allerdings können jene Neuronen über einen gewissen Zeitraum ihren Strukturstoffwechsel aufrechterhalten und sind potentiell revitalisierbar (Siesjo 1984; Fierbach et al. 2003) Für diesen Bereich führten Astrup et al. ursprünglich den Begriff der „Penumbra“ (=Halbschatten) ein (Astrup et al. 1981). Seit dieser Entdeckung steht die genannte Region im Focus der Forschungsinteressen, um im Falle einer Ischämie, einen Progress des Zelltods zu verhindern und diese Neuronen durch therapeutische Interventionen wieder in den physiologischen Funktionsstoffwechsel zurückzuführen. Das Konzept der Penumbra ist daher die Grundlage aller therapeutischen Überlegungen zur Neuroprotektion und rekanalisierender Maßnahmen.

Während einer fokalen zerebralen Ischämie führen mehrere zelluläre Mechanismen zum Zellschaden, die in ihrer Gesamtheit als "postischämische Kaskade" bezeichnet werden. Durch diese Prozesse, zu denen Exzitotoxizität, Freisetzung von Radikalen, Inflammation und Zelltod durch Apoptose gehören, kann das vulnerable Gebiet der Penumbra derart geschädigt werden, dass es auch hier zum irreversiblen neuronalen Schaden kommt, was folglich zu einer Vergrößerung des ischämischen Areals führt (Ginsberg 2003).

Die Frühphase dieser pathologischen Prozesse ist gekennzeichnet durch die Phase der Exzitotoxizität. Da der Funktionsstoffwechsel des Gehirns ausschließlich von der oxidativen Glykolyse abhängt, kommt es durch die ischämiebedingte Unterbrechung der Sauerstoff- und Glukosezufuhr zu einem Mangel an energiereichen Phosphaten und zu einem konsekutiven Versagen der Natrium/Kalium-Pumpe. Hieraus resultieren eine Depolarisation der Zellmembran und eine gleichzeitige Aktivierung der spannungsabhängigen Kalzium- Natriumkanäle. Beide Vorgänge bewirken eine vermehrte

präsynaptische Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat. Desweiteren kommt es einem Zusammenbruch der energieabhängigen Glutamatwiederaufnahme, wodurch sich die extrazelluläre Glutamatkonzentration weiter erhöht (Block et al. 1999; Dirnagel et al. 1999). In vitro konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte extrazelluläre Glutamatspiegel zum Untergang neuronaler Zellkulturen führt (Choi et al. 1987). In Folge der übermäßigen Glutamatkonzentration kommt es zu einer Überstimulation der Glutamatrezeptoren, insbesondere der NMDA-Rezeptoren, wodurch Kalzium über spannungsabhängige und rezeptorgebundene Kanäle in die Zelle strömt. Auf Grund des vorherrschenden Energiemangels kann das intrazelluläre Kalzium nicht aus der Zelle transportiert werden. Stattdessen wird zusätzlich postischämisch Kalzium aus den intrazellulären Speichern ins Zytosol frei gesetzt, so dass nach einer Ischämie ein deutlich erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel nachzuweisen ist. Diese erhöhte Kalziumkonzentration führt zu einer Aktivitätszunahme von diversen Enzymen, wie u.a. Proteasen, NO-Synthetasen, Phospholipasen oder Endonukleasen, welche wiederum zu einer Schädigung von Zellorganellen führen (Block et al. 1999; Sakamoto et al. 1986).

Ferner werden in dieser Phase vermehrt freie Radikale gebildet, deren Bildung und Abbau unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht liegen. Durch die Ischämie verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Bildung der Radikale, die dann DNA, Proteine und Lipide schädigen können und einen Zelltod verursachen können (Siesjö 1992).

Der Vorgang der Inflammation spielt insbesondere in der späteren Phase der postischämischen Kaskade eine wichtige Rolle. Durch die Ischämie wird eine Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Leukozyten in das Hirngewebe verursacht. Zusätzlich werden lokale Astrozyten und Mikroglia aktiviert, die ebenfalls wie die erwähnten Leukozyten potentiell neurotoxische Substanzen sezernieren (Arvin et al. 1996).

Ein weiteres Konzept der postischämischen Schädigung betrifft die perifokale postischämische „Spreading Depression“ (Nedergaard 1996). Dieser Prozess spielt sich in unterschiedlichen zeitlichen Intervallen im Grenzbereich des kortikalen Infarktgebiets in der ipsilateralen Hemisphäre ab und führt zu einer erhöhten metabolischen Aktivität. Im Tiermodell konnte festgestellt werden, dass in Bereichen der „Spreading Depression“ der erhöhte Metabolismus durch eine Perfusionssteigerung charakterisiert ist. Erfolgt jedoch keine adäquate Durchblutungssteigerung, kommt es infolge des erhöhten Sauerstoffbedarfs zu einer Vergrößerung des Infarktareals. (Hamann 1997; Back et al. 1994).

In der Spätphase der postischämischen Kaskade ereignet sich der „programmierte Zelltod“, die sogenannte Apoptose. Durch irreversible zelluläre Schädigungen werden eine Reihe von endogenen Proteasen aktiviert, um den Zellkern samt DNA kontrolliert abzubauen. Dieser systematische Vorgang soll zu einer verminderten Freisetzung toxischer Substanzen führen und damit Kollateralschäden an benachbarten noch vitalen Zellen vermindern (Walberer 2005; Padosch et al. 2001; Hockenberry 1995).

Die genannten Mechanismen laufen nach Beginn der Durchblutungsunterbrechung kaskadenartig über Stunden und Tage ab, wobei die einzelnen Schädigungsmechanismen sich teils zeitlich überlappen und teils auch gegenseitig perpetuieren. Die daraus resultierende Komplexität der postischämischen Kaskade mit der Vielzahl zellschädigender Mechanismen macht die Entwicklung neuroprotektiver Therapiestrategien, die in der Vergangenheit zumeist auf der pharmakologischen Blockade eines einzelnen Mechanismus abzielten (z.B. Einsatz von Glutamatantagonisten), so schwierig.

2. Therapie des Hirninfarkts und des Hirnödems - State of the Art

Die „Stroke Unit“ ist Dreh- und Angelpunkt der Diagnostik, der Akuttherapie, der Sekundärprophylaxe und der frühen Rehabilitation und stellt die Schnittstelle zur weiteren stationären Rehabilitationsbehandlung dar. Mit der Etablierung von Stroke Units konnten Mortalität und Pflegebedürftigkeit um 25-30% gesenkt werden. Ferner wurde belegt, dass durch die Behandlung auf einer Stroke Unit sowohl die Länge des Krankenhausaufenthalts als auch die Gesamtkosten gesenkt werden (Sobesky 2009; Terent et al. 2009; Zhu et al. 2009; Hamann et al. 2010). Die bemerkenswerte Effizienz dieses Therapiekonzept beruht auf einer strukturierten, interdisziplinären Kooperation von Neurologen, Neurochirurgen, Internisten, Logopäden, Ergotherapeuten, Physiotherapeuten, Neuropsychologen und - nicht zuletzt - dem Rettungsdienst. Die Prähospitalphase entscheidet häufig bereits über die Prognose des Patienten, da der frühe Behandlungsbeginn insbesondere für die rekanalisierende Behandlung von größter Bedeutung ist („time is brain“). Die systemische Lyse stellt einen Grundpfeiler der Therapie eines akuten ischämischen Schlaganfalls - und die bislang einzig *kausale* Behandlungsmöglichkeit - dar. Oberstes Ziel ist dabei die schnellstmögliche Wiederherstellung der zerebralen Perfusion. Für diese Indikation ist in Deutschland aktuell lediglich rt-PA („recombinant tissue plasminogen activator“) zugelassen. Der Behandlungseffekt der systemischen Thrombolysetherapie ist deutlich zeitabhängig (Hacke et al. 2004). Je früher eine Rekanalisation durchgeführt wird, umso höher ist der

Benefit einer Reperfusion. Ebenfalls erhöht sich dramatisch die „number-needed-to-treat“ (NNT) zur Verbesserung des klinischen Outcomes, je mehr Zeit bereits zwischen Symptom- und Thrombolysebeginn vergangen ist (Lichy et al. 2010). Anhand der Daten aus den Studien NINDS, ECASS III und Atlantis konnte ermittelt werden, dass innerhalb von 90 Minuten 3 Patienten behandelt werden müssen, um einen Therapieerfolg zu erzielen (definiert als 0-1 Punkt auf der modifizierten Ranking-Skala, mRs). Zwischen 0 und 3 Stunden war mit einem Anstieg der NNT auf 7 zu rechnen und zwischen 3 und 4,5 Stunden steigt die NNT auf 14 an. (NINDS 1995; Hacke et al. 2004, 2008). Durch die im Jahre 2008 publizierte ECASS III Studie konnte erstmals belegt werden, dass die Effektivität und sichere Anwendung der intravenösen Thrombolyse auch in einem erweiterten Zeitfenster von 4,5h - statt der bis dato festgelegten 3h - sichergestellt ist (Hacke et al. 2008; Wahlgren et al. 2008).

Neben einer systemischen Lyse besteht die Möglichkeit einer lokalen, intraarteriellen Thrombolyse. So konnte in der PROACT-II Studie nachgewiesen werden, dass durch die lokale Applikation von rekombinater Urokinase die Rekanalisationsrate erhöht und ein besseres funktionelles Outcome erzielt werden konnte (Furlan et al. 1999). Derzeit besteht in der Bundesrepublik Deutschland keine Zulassung für Urokinase. Allerdings wird in zahlreichen Zentren die intraarterielle Lyse als individueller Heilversuch durchgeführt. Ferner wird in zahlreichen Kliniken bei Vorliegen eines Karotis-T oder Mediahauptstammverschlusses eine überbrückende Therapie („Bridging-Verfahren“) mit zunächst systemischer Gabe durchgeführt, gefolgt von einer lokalen rt-PA- Applikation (Lichy et al. 2010; Eckert 2009). Neben der Möglichkeit einer pharmakologischen Thrombolyse besteht zudem die Option einer mechanischen Rekanalisierung. Durch Verwendung von sogenannten „clot-trieval devices“ ist es möglich, Thromben aus dem Gefäß zu entfernen. Hierzu werden unterschiedliche Mikrokathetersysteme verwendet (Trenkler 2008). Bei Vorliegen von hochgradigen Gefäßstenosen ist es zusätzlich möglich, eine Angioplastie durchzuführen, um so die stenosierende Gefäßpassage zu rekanalisieren. Der Einsatz von selbstexpandierenden Stents bietet zusätzlich eine vielversprechende Therapieoption bei Gefäßstenosen (Trenkler 2008; Klein 2007).

Die quantitative Bedeutung der lokalen oder systemischen Lyse darf bei der Betrachtung des Therapieerfolges des Stroke Unit-Konzepts jedoch nicht überbewertet werden. Tatsächlich werden derzeit lediglich etwa 4,5% der Schlaganfall-Patienten einer thrombolytischen Therapie unterzogen. Dieser Umstand ist zurückzuführen auf die sehr strikten Anwendungseinschränkungen und Kontraindikationen der Lyse-Therapie, wie beispielsweise das enge Zeitfenster, das Alter oder eine bestehende Antikoagulation

(Foerch et al. 2009). Unabhängig vom Alter des Patienten ist hingegen die Effektivität der Stroke Unit-Behandlung. So konnte festgestellt werden, dass es keine obere Altersgrenze für die Stroke Unit gibt, da innerhalb aller Altersgruppen die Mortalität in den ersten 30 Tagen signifikant reduziert werden konnte, im Gegensatz zur Behandlung auf einer „normalen“ Station (Liebetrau et al. 2010; Saposnik et al. 2009).

Bedeutsamer für die Effektivität der Stroke Unit ist die Durchführung von "Allgemeinmaßnahmen" wie: Vermeidung von Hypoxien, konsequente Überwachung des Blutdruckes zur Vermeidung sowohl von hypo- als auch von hypertonen Phasen, Blutzuckermanagement, die Behandlung von Fieber und eine frühzeitige Thromboseprophylaxe (Sobesky 2009; Sandercock et al. 2008; Langhorne et al. 2002; Ahmed et al. 2009). Die häufigste Komplikation des Schlaganfalls stellt die Pneumonie dar, welche zu 50% auf eine Aspiration zurückzuführen ist. Daher empfiehlt die European Stroke Organisation (ESO) die regelmäßige Durchführung von Schlucktests und die frühzeitige Einleitung einer antibiotischen Therapie (Sobesky 2009; ESO-Guidelines 2008).

Therapieverfahren zur Ödembehandlung

Die Ausbildung eines vasogenen Hirnödems stellt eine häufige und gefürchtete Komplikation des akuten Hirninfarkts dar. Es entsteht durch die ischämische Schädigung der Bestandteile der Blut-Hirn-Schranke, begründet im Verlust der „tight junctions“ und Extravasation von Flüssigkeit. Die zellulären Komponenten der Blut-Hirn-Schranke setzen sich aus Perizyten, Endothezellen, Astrozyten und Extrazellulärmatrix zusammen. Kommt es zum ischämisch-bedingten Ausfall nur eines Bestandteils, kommt es zum Zusammenbruch der „tight-junctions“ und führt zwangsläufig zur Ausbildung des sogenannten „vasogenen Ödems“ (Oldendorf et al. 1977; Hawkins et al. 2005; Del Zoppo et al. 2006, Sandoval et al. 2008, von Tell et al. 2006, Abbott et al. 2006, Koehler et al., 2006, Trenkler 2008). Infolge der zerebralen Ischämie kommt es ebenfalls zur Induktion von Mediatoren, wie Matrix- Proteasen, NO-Synthetasen, VEGF und Thrombin, die auf unterschiedliche Wirkungsweisen die Bluthirnschranke manipulieren und somit die Ausbreitung des vasogenen Ödems negativ beeinflussen (Treadwell et al. 2010; Rosenberg et al. 2007; Asahi et al. 2001; Fukuda et al. 2004; Iadecola et al. 1996; Weis et al. 2005; Lee et al. 1996).

Die Entwicklung des Hirnödems beginnt bereits in den ersten Stunden nach dem Schlaganfall (Davalos et al. 1999) und weist nach etwa 4 Tagen ihr Maximum auf (Shaw

et al. 1959). Die Volumenexpansion im Infarktareal führt zu einer Steigerung des intrakraniellen Drucks. Dieser raumfordernde Effekt ist bei ausgedehnten territorialen Infarkten so massiv, dass es zu Massenverschiebungen und Verlagerungen von intrakraniellen Komponenten kommt, was letztlich zur zerebralen Herniation führt.

Durch den erhöhten intrakraniellen Druck kann es ferner zu einer mechanischen Kompression von Kollateralkreisläufen kommen, wodurch der regionale Blutfluss im Infarktareal abnimmt und eine weiteren Schädigung des Hirnparenchyms resultiert (Jüttler et al. 2007; Engelhorn et al. 1999; Walberer 2005).

Im Jahre 1996 führte die Arbeitsgruppe um Hacke et al. (1996) den Begriff des „malignen Mediainfarkts“ ein. Hierbei handelt es sich um subtotale bzw. komplette Infarzierungen im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media durch einen proximalen Hauptstammverschluss der A. cerebri media oder einen distalen Verschluss der A. communis interna mit erheblichem Raumforderungseffekt. Die Prognose eines solchen malignen Mediainfarkts ist äußerst schlecht, die Mortalität unter konservativer Behandlung liegt bei etwa 80% (Hacke et al. 1996; Hossmann 2006; Engelhorn et al. 2004).

Zur Behandlung des erhöhten intrakraniellen Drucks bei raumfordernden Hirninfarkten ist eine Reihe von Verfahren etabliert, die jedoch einigen Limitationen unterliegen.

Die Oberkörperhochlagerung um 30° gilt bei Hirntraumapatienten als etabliert und kann den intrakraniellen Druck signifikant senken (Feldmann et al. 1992). Beim raumfordernden Schlaganfall und insbesondere bei Vorliegen eines „malignen Mediainfarkts“ ist jedoch offensichtlich nur eine leichte Drucksenkung möglich (Schwarz et al. 2002). Dennoch zählt die Oberkörperhochlagerung in den aktuellen deutschen Leitlinien, neben einer ausreichenden Analgosedierung zu den empfohlenen Basismaßnahmen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2009).

Eine weitere nicht-medikamentöse Möglichkeit den zerebralen Druck zu senken besteht in einer moderaten Hyperventilation. Durch einen niedrigen pCO₂ (30-40 mmHg) lässt sich eine zerebrale Vasokonstriktion herbeiführen, was folglich zu einer Absenkung des intrakraniellen Blutvolumens und somit zu einer signifikanten Reduktion des intrakraniellen Drucks führt. Allerdings kann die Vasokonstriktion auch zu einer verminderten zerebralen Perfusion führen, was sich in Hinblick auf die kritisch verminderte Durchblutung in der Penumbra region kontraproduktiv auswirken und zu einer Vergrößerung des ischämischen Areals führen kann. Daher gilt die Hyperventilation als kurzfristig wirksame „Ultima ratio“ zur Behandlung von Hirndruckspitzen und wird nicht zur langfristigen Hirndruckbehandlung empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2009, Diedler et al. 2008; Muizelaar et al. 1991; Marion et al. 2002).

Zu den erweiterten medikamentösen Maßnahmen bei erhöhtem intrakraniellm Druck gehört der Einsatz von Osmotherapeutika wie beispielsweise Mannitol oder Glycerol. Durch den Einsatz osmotisch wirksamer Substanzen wird ein Gradient über der Blut-Hirn-Schranke erzeugt, wodurch Wasser aus dem Interstitium ins Gefäßsystem verschoben wird (Diedler et al. 2008, Huttner et al. 2009). Zwar kann die Mannitoltherapie eine kurzfristige Senkung des intrakraniellen Drucks bewirken, jedoch besteht in der Langzeitanwendung die Gefahr eines Reboundphänomens durch Akkumulation im Hirngewebe und konsekutiv folgender Hirnschwellung (Bardutzky et al. 2007; Bereczki et al. 2007; Paczynski et al. 1997). Ähnliches gilt für den Einsatz hypertoner Kochsalzlösungen (Kempski 2005) und für Glycerol. Glycerol gehört dabei zu den am häufigsten getesteten Osmotherapeutika mit möglicherweise etwas geringeren Nebenwirkungen. Glycerol wirkt kurzfristig druckmildernd, sollte jedoch ebenfalls wegen des Reboundphänomens nicht über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden (Bardutzky et al. 2007; Righetti et al. 2009).

Durch den Einsatz von Barbituraten, wie beispielsweise Thiopental, lässt sich der zerebrale Metabolismus medikamentös reduzieren, was sich in der kritisch angespannten Versorgungssituation der Penumbra positiv auswirken kann. Allerdings birgt der Einsatz dieser Präparate die Gefahr von Hypotonien, Leberfunktionsstörungen und ein erhöhtes Risiko von Infektionen. Zusätzlich muss unter Barbituratnarkose ein permanentes ICP, EEG und hämodynamisches Monitoring erfolgen, was einen weiteren logistischen Anspruch an die Behandlung des Patienten stellt. (Schwab et al. 1997; Bardutzky et al. 2007).

Durch sogenannte THAM (Tris-Hydroxy-Methyl-Aminomethan)-Puffer ist es im Tiermodell möglich, mittels Alkalose-induzierter Vasokonstriktion den intrakraniellen Druck zu senken, der dem Effekt einer Hyperventilation ähnelt (Yoshida et al. 1991; Nagao et al. 1996). Jedoch gibt es keine evidenzbasierte klinische Studienlage diesbezüglich. Nichtsdestotrotz erwägen einige Autoren den Einsatz von THAM-Puffern im klinischen Alltag zur Hirnödembehandlung (Steiner et al. 2001, Schwab 2005).

Der Einsatz von Indomethacin, Furosemid und Kortikosteroiden erscheint auf Grund der vorliegenden Daten eher kontraproduktiv und wird daher in den aktuellen Leitlinien explizit nicht empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2009).

Die dekompressive Hemikraniektomie stellt eine wirksame Möglichkeit zur Entlastung dieses ödembedingten Raumforderungseffekts dar (Park et al. 2009). Durch die großzügige Entfernung von Anteilen des Os frontale, parietale, temporale und occipitale

wird ein annähernd runder Knochendefekt geschaffen, der im Durchmesser mindestens 12 cm betragen sollte. Zusätzlich wird eine großzügige Duraerweiterungsplastik angefertigt. (Robertson et al. 2004; Carandang et al. 2008). Durch diesen Defekt kann das anschwellende Hirngewebe expandieren. Dadurch sinkt der intrakranielle Druck und mechanische Komplikationen wie die Kompression noch nicht infarzierter Randbereiche um das Infarktgebiet, des Hirnstamms und des Ventrikelsystems werden reduziert (Diedler et al. 2009).

Nicht-randomisierte Studien und kleinere Fallserien legten schon früh nahe, dass im Falle eines malignen Mediainfarkts die dekompressive Kraniektomie die Mortalität senken kann (Rieke et al. 1995; Morley et al. 2002). Mehrere Arbeitsgruppen vermuteten, dass insbesondere eine frühzeitig durchgeführte Kraniektomie mit einem verbesserten klinischen Outcome korreliert (Schwab et al. 1998). Diese Vermutung konnten 2007 in einer Metaanalyse dreier randomisierter klinischer Studien (DECIMAL, HAMLET und DESTINY) eindrucksvoll belegt werden (Vahedi et al. 2007; Hofmeijer et al. 2006, Jüttler et al. 2007). Hierbei wurde deutlich, dass durch die Hemikraniektomie die Mortalität von 71% auf 22% gesenkt wurde. Auch das klinische Outcome der überlebenden Patienten stellte sich in der Operationsgruppe überraschend positiv dar. Anhand der von Swieten et al. (1988) entwickelten „modified-Ranking-scale“ (mRs), wiesen 14% der operierten Patienten ein Jahr nach dem Infarktereignis einen Score von 2 auf. Dieses positive Ergebnis ist angesichts der durch die Studieneinschlusskriterien definierten, außerordentlichen Schwere des Erkrankungsbildes erstaunlich und legt den Verdacht nahe, dass die operative Dekompression bei einigen Patienten nicht nur lebensrettend, sondern auch im engeren Sinne neuroprotektiv, d.h. infarktgrößenmindernd gewirkt haben könnte (Hacke et al. 1996; van Swieten et al. 1988; Vahedi et al. 2007).

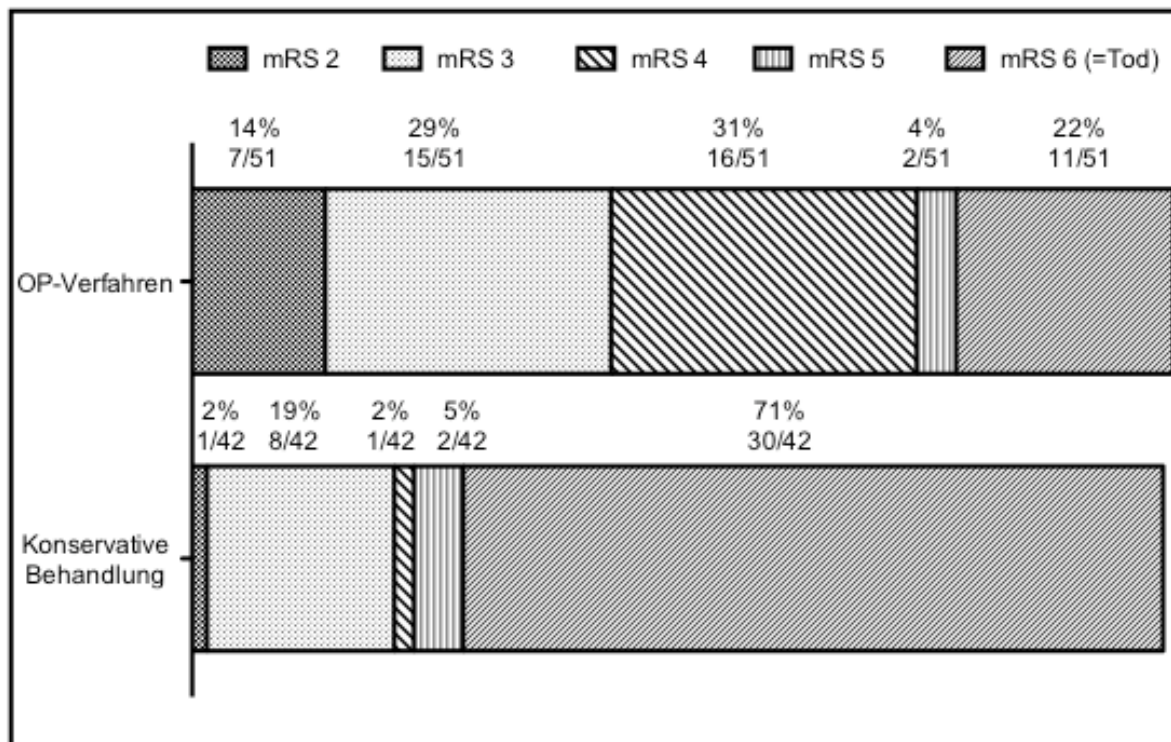


Abb. 45: Graphische Darstellung der Verteilung der mRS-Scores 12 Monaten nach Behandlung mit dekompressiver Chirurgie oder konservativer Therapie (nach Vahedi et al. 2007)

3. Zukünftige Behandlungsmöglichkeiten des Hirninfarkts

Die Lyse-Behandlung und das Stroke Unit Konzept stellen derzeit die beiden Säulen der evidenzbasierten Schlaganfallbehandlung dar. Beide Verfahren sind nachweislich effektiv und in Deutschland weit verbreitet. Dennoch wären weitere und effektivere Behandlungsmöglichkeiten wünschenswert. Daher konzentriert sich die präklinische und klinische Forschung auf die Entwicklung pharmakologischer und nichtpharmakologischer Neuroprotektionsverfahren.

Neben den pharmakologischen Therapieansätzen wurden in den vergangenen Jahren zunehmend nicht-pharmakologische Neuroprotektionsverfahren getestet. Eine mögliche klinische Anwendung könnte in Zukunft die Hypothermie-Behandlung erfahren. Seit Jahren wird dieses Verfahren in der Kardiochirurgie zur Neuroprotektion angewendet. Auch nach Reanimationen bei Kammerflimmern hat sich eine milde Hypothermiebehandlung prognoseverbessernd erwiesen und ist seit 2003 Bestandteil der Therapieempfehlungen (Vogt et al. 2011; Nolan et al. 2003; Maher et al. 1993; Reith et al. 1996; Hamann 1997, Schwab et al. 2001). Aus tierexperimentellen Studien ist nachgewiesen, dass durch die Hypothermie u.a. über eine Reduktion des zerebralen Metabolismus eine Reihe von

neuroprotektiven Effekten bewirkt. Die Hypothermie führt zu einer verminderten Freisetzung freier Radikale und exzitatorischer Transmitter und reduziert die inflammatorische Antwort innerhalb der postischämischen Kaskade (Georgiadis et al. 2005; Maier et al. 1998). Einige nicht-randomisierte klinische Studien beschreiben ein verbessertes funktionales Outcome der Patienten, sowohl kurz- als auch langfristig (Milhaud et al. 2005; Schwab et al. 2001). Nichtsdestotrotz sollten nicht nur auf Grund der Nebenwirkungen (Erhöhter intrakranieller Druck in der Wiedererwärmungsphase, arterielle Hypotonie, Bradykardie und Pneumonie) die Wirksamkeit der Hypothermie-Therapie in randomisierten klinischen Studien belegt werden, um eine sichere standardisierte Behandlung zu gewährleisten (Georgiadis et al. 2005; Bardutzky et al. 2007). Aktuell wird die Hypothermie auch zur Behandlung des malignen Hirninfarktes nicht empfohlen (DGN-Leitlinien:<http://www.dgn.org/inhalte-a-z/535-leitlinien-der-dgn-akuttherapie-des-ischamischen-schlaganfalls.html>).

Pharmakologische Neuroprotektionsverfahren werden seit mehr als 4 Jahrzehnten intensiv beforscht (Gladstone et al. 2002; O`Collins et al. 2006; Ginsberg 2009). Sie beruhen typischerweise auf der Blockade einzelner pathophysiologischer Schlüsselmechanismen in der postischämischen Kaskade und führen im günstigsten Falle zu einer Reduktion der Infarktgröße und damit zu einer Verbesserung des klinischen Outcomes (Wiebers et al. 1990; Gladstone et al. 2002; Rogalewski et al. 2008, Schabitz et al. 2006). Einige Autoren vermuten zudem, dass die kombinierte Behandlung einer neuroprotektiven Substanz und der etablierten Thrombolyse Vorteile in Form eines verbesserten klinischen Outcomes ermöglicht. Außerdem könnte durch den Einsatz von Neuroprotektiva das Zeitfenster für die Durchführung der Thrombolyse erweitert werden (Wagner et al. 2004; Green 2008).

In den vergangenen Jahren wurden in tierexperimentellen Studien mehr als 1000 vielsprechende neuroprotektive Substanzen getestet. Diese präklinische Forschung mündete in mehr als 400 kontrollierten klinischen Studien, die allerdings ausnahmslos negativ verliefen. Daher finden derzeit keine dieser Substanzen eine klinische Anwendung (Green 2002; Wahlgren et al. 2004; O`Collins et al. 2006; Savitz et al. 2007; Ginsberg 2009; Fisher 2011, Faden et al. 2007).

Die Gründe für die mangelnde Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf die klinische Realität sind multifaktoriell und beinhalten häufig eine unzureichende präklinische Evaluation. Nach intensiver und kritischer Fehleranalyse wurden folgende Empfehlungen und Kriterien formuliert, um zukünftig eine verbesserte Übertragbarkeit der

tierexperimentellen Ergebnisse zu gewährleisten. (STAIR 1999; Fischer et al. 2007; Rogalewski et al. 2008):

Ein wesentlicher Kritikpunkt ist die insuffiziente präklinische Evaluation hinsichtlich des Zeitfensters und der funktionellen Endpunkte (Outcome-Analyse). Das therapeutische Fenster unterscheidet sich erheblich bei verschiedenen Spezies und wird von unterschiedlichen Faktoren wie Substanz-Interaktionen, Temperatur oder kollateraler Zirkulation beeinflusst. Eine frühzeitige Substanzapplikation verspricht den besten Erfolg und wird daher häufig in tierexperimentellen Studien angewendet. Hingegen sind extrem frühe Applikationszeitpunkte im klinischen Alltag unrealistisch, da zwischen Symptom- und Behandlungsbeginn in der Regel mehrere Stunden vergehen (Jonas et al. 2001).

Zuweilen wird die Einschätzung der neuroprotektiven Wirksamkeit tierexperimentell auf den Effekt bezüglich des Läsionsvolumens, Mortalität und Komplikationen reduziert. Dies sollte um die Erstellung von klinisch-neurologischen Scores insbesondere von Langzeitergebnissen ergänzt werden, um die Funktionalität sowohl kurzfristig als auch langfristig zu beurteilen (Braeuninger et al. 2009).

Um dem heterogenen Bild des menschlichen Schlaganfalls gerecht zu werden, was die unterschiedlichen Infarktlokalisationen und Infarktetiologien angeht, sollten bei Tieren sowohl transiente als auch permanente Ischämien induziert werden, um einen adäquaten Vergleich zu ermöglichen (Rogalewski et al. 2008).

Beim Transfer von tierexperimentellen Daten wie Dosierungen von Substanzen sollte ebenfalls beachtet werden, dass Nager auf Grund eines anderen Substanzmetabolismus meist höhere Dosen pro Kilogramm Körpergewicht benötigen. Zudem werden im Tierexperiment oft unrealistisch hohe Dosierung gewählt, um Effekte zu demonstrieren. In klinischen Studien kommen dann zur Vermeidung von Nebenwirkungen häufig niedrigere Dosierungen zum Einsatz, so dass teilweise die menschliche Blut-Hirn-Schranke nicht überwunden wird. Zudem fehlen nicht selten Dosis-Wirkungskurven zur Bestimmung der minimal effektiven Dosis (Rogalweski et al. 2008).

Zusätzlich sollten in präklinischen Studien physiologische Parameter wie Blutgase, Blutglukose, Blutdruck und Temperatur intensiv erhoben und beurteilt werden, da sie die Messergebnisse auf unterschiedlichste Weise beeinflussen können.

Die genannten Gründe wurden erstmals 1999 von einem Konsortium („STAIR“) aus Wissenschaftlern und Industrievertretern erstellt, um Mindestanforderungen für Studien mit Neuroprotektiva zu erstellen. Die Kriterien wurden ständig weiterentwickelt, so dass heute zusammenfassend formuliert werden kann, dass präklinische Studien eine Testung des funktionellen neurologischen Outcomes auch im Langzeitverlauf, sowie die Evaluation in

klinischen relevanten Ischämie-Modellen beinhalten sollten. Des Weiteren sind die Wahl des Zeitfensters und die Beurteilung der Blut-Hirn-Schrankenpermeabilität von besonderer Wichtigkeit. (STAIR 1999, 2001; Fischer et al. 2003, 2005, 2007; Rogalweski et al. 2008).

Neuroprotektiva können an ganz unterschiedlichen Stellen innerhalb der postischämischen Kaskade ansetzen. Die ersten getesteten Substanzen zielten auf die Glutamattoxizität. So wurden mehrfach Versuche mit NMDA- und AMPA-Rezeptorantagonisten unternommen, um die Folgen der erhöhten Glutamatkonzentration zu senken. In tierexperimentellen Studien konnte durchaus ein neuroprotektiver Effekt erzielt werden, in dem NMDA-Rezeptorantagonisten eine Reduktion des Läsionsvolumens bewirkten (Block et al. 1996; Katsuta et al. 1995; Di et al. 1997; Yang et al. 2003). Allerdings konnten diese Ergebnisse in klinischen Studien nicht reproduziert werden und mussten teilweise auf Grund erheblicher Nebenwirkungen eingestellt werden (Yurkewicz et al. 2005; Block et al. 1999).

Magnesium stellte sich im Tierversuch ebenfalls als aussichtsreiche und gut verträgliche Substanz dar (Lin et al. 2002; Yang et al. 2000). Magnesium besitzt die Besonderheit gleich in mehrere Schritte der Kaskade einzugreifen. Zum einen wirkt es NMDA-antagonistisch (Nowak et al. 1984), zum anderen bewirkt es die Reduktion der präsynaptischen Glutamatkonzentration (Lin et al. 2002; Ovbiagele et al. 2003). Leider konnten Muir et al. (2004) in einer klinischen multizentrischen Studie keine Reduktion der Mortalität oder des Behinderungsgrad feststellen (Muir et al. 2004).

Ferner konnte in präklinischen Studien ein neuroprotektiver Effekt von Radikalfängern belegt werden (Henry et al. 1998; Salom et al. 2004). Auch anti-inflammatorische Zytokine zeigten in tierexperimentellen Untersuchungen eine Minderung des ischämiebedingten Zellschadens, wodurch eine Neuroprotektion erreicht wird (Barone et al. 1997; Relton et al. 1992). Weitere positive Ergebnisse lassen sich aus der Verwendung mit Albumin, 5-HT_{1A} Antagonisten, Metall-Chelatoren oder Astrozyten-Modulatoren erkennen (Liu et al. 2001; Mauler et al. 2005; Angel et al. 2004; Asano et al. 2005). Dennoch konnten sich die genannten Substanzen bisher aus unterschiedlichsten Gründen nicht in der klinischen Anwendung etablieren, so dass sie teilweise verworfen wurden, oder derzeit näheren Untersuchungen unterzogen werden müssen (Green 2008).

4. RNase - Eine neues Wirkprinzip in der pharmakologischen Neuroprotektion des Hirninfarkts

Bedingt durch fokale zerebrale Ischämien kommt es zu Zellnekrosen mit konsekutiver Freisetzung plasmatischer Nukleinsäuren, insbesondere von RNA. Überraschenderweise hat die freigesetzte RNA im extrazellulären Bereich offenbar eine Reihe bisher unbekannter biologischer Funktionen, die erst in den letzten Jahren identifiziert werden konnten (Fischer et al. 2007; Nakazawa et al. 2005; Kannemeier et al., 2007).

Zum einen hat extrazellulär gelegene RNA offenbar Einfluss auf die Gerinnungskaskade. So verfügt freie RNA über eine prokoagulatorische Wirkung. Sie aktiviert die Factor VII-activating protease (FSAP) und fungiert somit als Kofaktor in der Hämostase. Ferner aktiviert freie RNA die Gerinnungsfaktoren XI und XII, was zu einer schnelleren Unterbindung von Blutungen führt (Nakazawa et al. 2005; Kannemeier et al. 2007; Preissner 2007).

Freie RNA scheint darüber hinaus auch Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirnschranke auszuüben. Anhand von in-vitro Modellen konnte nachgewiesen werden, dass RNA eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verursacht. Dieser Mechanismus wird offenbar durch den vascular endothelial growth factor (VEGF) vermittelt. Durch die Interaktion zwischen RNA und VEGF, werden Rezeptorkanäle (VEGF-R2) auf Endothezellen aktiviert, was zu einer signifikanten Steigerung des Wasserdurchflusses und zu einem Zusammenbruch der „tight junctions“ führt (Fischer et al. 2007; De Vries et al. 1992; Shibuya 2001). Es ist naheliegend zu vermuten, dass diese pathologische Permeabilitätssteigerung bei akuten Hirninfarkten (und zahlreichen anderen Erkrankungen) zur Bildung des vasogenen Ödems beiträgt (Baethmann et al. 1997; Schoch et al. 2002, McDonald et al. 1993).

Aus klinischer Sicht ist dieser neu entdeckte Pathomechanismus interessant, da freie Nukleinsäuren durch Nukleasen abbaubar sind und somit therapeutisch eingesetzt werden könnten.

In vitro-Versuche machten deutlich, dass die RNA-bedingte Permeabilitätssteigerung im Blut-Hirnschrankenmodell durch Zugabe von RNase hemmbar ist (Fischer et al. 2007). Damit ist dieser Schädigungsmechanismus grundsätzlich einer Therapie, z.B. durch die intravenöse Applikation von RNase, zugänglich (Fischer et al. 2007). In einem Tiermodell zur fokalen zerebralen Ischämie wurde dieses innovative Therapiekonzept erstmals an Ratten in vivo erprobt. Um die Auswirkungen der RNase-Therapie zu überprüfen, wurden sowohl der zerebrale Wassergehalt postmortal ermittelt, als auch das ischämische Läsionsvolumen mittels MRT-Untersuchung. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass

die intravenöse Verabreichung von RNase einen ausgeprägten ödemprotektiven Effekt verursachte. Erstaunlicherweise zeigte sich dabei, dass neben der ödemreduzierenden Wirkung, auch eine Reduktion der ischämischen Läsionsvolumina und somit eine erhebliche neuroprotektive Wirkung feststellbar war (Fischer et al. 2007).

Mit der vorliegenden Arbeit soll daher eine mögliche Kausalität von ödemprotektiver und infarkt volumenreduzierender neuroprotektiver Wirkung der RNase-Behandlung im tierexperimentellen Schlaganfallmodell geklärt werden.

5. Neuroprotektion durch Ödemprotektion? Das Konzept der "Sekundären Neuroprotektion"

Infarkt- und Ödemreduktion durch RNase

Die vorliegende Arbeit konnte die Beobachtungen von Fischer et al. (2007) bezüglich der infarkt- und ödemreduzierenden Wirkung von RNase reproduzieren. So konnte in Experiment IV nachgewiesen werden, dass die Verwendung von RNase im Tiermodell eine signifikante Reduktion des vasogenen Ödems und des Infarktvolumens bewirkt. Da in den durchgeführten Experimenten Infarkt- und Ödemreduktion parallel auftraten, war aus methodischer Hinsicht zu beachten, dass eine Reduktion des Infarktvolumens naturgemäß auch die Masse des ödematös veränderten Gewebes beeinflusst und somit zu einer Überschätzung der Ödemreduktion führen kann. Dies betrifft die Methoden, die das Ödemvolumen der gesamten Hemisphäre erfassen (Mittellinienverlagerung und Nass-Trocken-Methode). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich magnetresonanztomographisch T2-Relaxationszeiten in „Regions-of-Interst“ (ROI) gemessen, die unabhängig von der Infarktgröße eine Bestimmung des Wassergehalts ermöglichen (Gerriets et al. 2004). Die T2-Relaxationszeit korreliert gut mit den Ergebnissen der Nass-Trocken-Methode zur Bestimmung des zerebralen Wassergehalts. (Gerriets et al. 2004). Mit Hilfe der gemessenen T2-Relaxationszeiten konnten die Ergebnisse der übrigen Methoden bestätigt werden, dass die Behandlung mit RNase neben einer Infarktreduktion auch eine tatsächliche Ödemreduktion verursacht.

Etablierung der bilateralen Kraniektomie im Tiermodell (Experiment I und II)

Um die Bedeutung der Ödemreduktion für den infarktgrößenreduzierenden Effekt von RNase zu erfassen, war die Etablierung eines Tiermodells erforderlich, welches den komprimierenden Effekt der Ödembildung eliminiert. Damit wäre die Wirkung von RNase auf die Ödembildung und die Infarktgröße getrennt voneinander untersuchbar. Zu diesem Zweck wurde das Verfahren der bilateralen Kraniektomie entwickelt, welches sich an der

dekompressiven Hemikraniektomie, wie sie auch in der klinischen Routine eingesetzt wird, orientiert (Hacke et al. 1996; Schwab et al. 2002; Goldmann et al. 1997).

Zunächst wurde daher das etablierte Schlaganfallmodell an der Ratte um eine unilaterale Kraniektomie ergänzt (Hoell et al. 2002). In Experiment I wurden die Auswirkungen dieses Eingriffs überprüft. Die MRT-Bildgebung machte allerdings deutlich, dass es durch den geschaffenen ossären Defekt von ca. vier x acht mm zu ausgeprägten zerebralen Herniationen kommt (vergl. Abb. 21 auf S. 28). Insbesondere nach 24 Stunden waren zusätzliche ischämische Areale in den inkarzerierten Hirnteilen zu erkennen, was insgesamt eine größere Schädigung von Hirngewebe bedeutet und die Ergebnisse verfälschen könnte. Diese Komplikation tritt gelegentlich auch bei Menschen auf (Schwab et al. 1998; Sarov et al. 2010), wenn auch nicht in der Ausprägung wie in dem vorliegenden Rattenmodell. Eine mögliche Ursache liegt in dem Fehlen einer Duraplastik, die beim Menschen üblich ist, die in den vorliegenden Tierversuchen jedoch vermieden wurde, da diese zahlreiche Komplikationen (Infektionen, Liquorverlust, lokale Minderung des pCO₂, etc.) verursachen würden. Daher wurde zur Vermeidung von Herniationen die Größe des Kraniotomiedefekts drastisch erweitert, indem auch auf der Gegenseite der Knochen entfernt wurde („bilaterale“ Kraniektomie). Das Belassen eines Knochenstegs über dem Sinus sagittalis superior, der in der klinischen Routine gelegentlich üblich ist erwies sich im Tiermodell als nicht erforderlich, da der Knochen sicher und ohne Verletzung des Sinus abpräpariert werden kann. Dadurch wurde die Größe der Fensterung fast verdoppelt (ca. acht x acht mm). MRT-Untersuchungen zeigten im Verlauf, dass diese Modifikation des OP-Verfahrens zu einer Druckentlastung ohne Inkarceration von Hirngewebe führt (vergl. Abb. 22 auf S.29).

Eine mögliche methodische Schwäche der "bilateralen Kraniektomie" liegt in der Gefahr einer lokalen Auskühlung von Hirngewebe durch die fehlenden Knochenanteile. Da aus anderen Tierexperimenten bekannt ist, dass eine lokale ebenso wie eine systemische Hypothermie neuroprotektive Effekte im Sinne einer Infarktreaktion aufweist, wurden in Experiment II die Auswirkungen einer bilateralen Hemikraniektomie auf mögliche Kühleffekte untersucht (Maier et al. 1998; Fischer et al. 2005). Durch Anwendung einer sorgfältigen Präparationstechnik, welche die physiologische Blutzirkulation des den Knochendefekt bedeckenden Hautlappens bewahrte und einer sorgsamsten Nahttechnik, sollten Wärmeverluste durch das fehlende Knochensegment vermieden werden. In Experiment II wurde durch die Messung der lokalen Hirntemperatur unter dem Knochendefekt gezeigt, dass es durch die Technik der bilateralen Hemikraniektomie tatsächlich zu keiner nennenswerten lokalen Hypothermie kommt.

Einfluss des ödembedingten Raumforderungseffekts auf die Infarktgröße

Mit Experiment III wurde die Bedeutung des ödembedingten Raumforderungseffekts auf die Infarktgröße untersucht. Durch die bilaterale Kraniektomie wurde dabei die Kompressionswirkung des Hirnödems eliminiert. Die Hirninfarkte der Tiere mit intakter Schädelkalotte waren 24 Stunden nach Infarktinduktion im Mittel 2,3-fach größer als bei kraniektomierten Ratten. Damit ist bei ausgedehnten Hirninfarkten rund die Hälfte der Infarktgröße dem raumfordernden Effekt des Hirnödems zuzuschreiben. Überraschend ist zudem, dass sich der schädigende Effekt ödembedingter Raumforderungen bereits in der Frühphase des Infarktgeschehens auswirkt. So lag die Differenz der Infarktgrößen zwischen kraniektomierten und sham-operierten Tieren bereits 5 Stunden nach Ischämiebeginn in vergleichbarer Größenordnung wie nach 24 Stunden. Dieser Befund stützt frühere Beobachtungen, wonach es bereits in der Frühphase der postischämischen Kaskade zur Ausbildung eines vasogenen Ödems mit raumfordernden Effekt kommt (Gerriets et al. 2004, 2009).

Das infarktgrößenunabhängige Verfahren zur Bestimmung der Ödembildung durch Messung der T2-Relaxationszeit zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, was belegt, dass die Ödembildung durch die Operation nicht beeinflusst wird; lediglich der Kompressionseffekt wird vermindert.

Die vorliegenden Daten stehen in Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die tierexperimentell ebenfalls eine Reduktion der Infarktgröße durch Entlastungsoperationen gezeigt haben (Doerfler et al. 2001, 2002; Engelhorn et al. 1998, 1999, 2002, 2003; Hofmeijer et al. 2004). Im Unterschied zu den vorgenannten Studien zielte die vorliegende Arbeit jedoch nicht auf die Evaluation der dekompressiven Hemikraniektomie als Therapieverfahren, sondern auf der grundsätzlichen Bedeutung des ödembedingten Raumforderungseffekts auf die Infarktbildung ab. Dies wurde - im Gegensatz zu den genannten Arbeiten - durch einen deutlich radikaleren Ansatz realisiert (*bilaterale* Kraniektomie; Entlastungsoperation vor Infarktinduktion) um eine vollständige Elimination der Druckwirkung des Hirnödems zu bewerkstelligen (Doerfler et al. 2001, 2002; Engelhorn et al. 1998, 1999, 2002, 2003; Hofmeijer et al. 2004).

Bezüglich des genauen Wirkmechanismus, auf dem die operative Druckentlastung ihren neuroprotektiven Effekt entfaltet, haben verschiedene Autoren unterschiedliche Thesen entwickelt: Mit Hilfe der perfusionsgewichteten-MRT konnten erstmals Engelhorn et al. (1999) nach unilateraler Kraniektomie einen Anstieg der Durchblutung in Kortexarealen der ischämischen Hemisphäre nachweisen (Engelhorn et al. 1999). Neben einer verbesserten kortikalen Durchblutung, wird im Allgemeinen durch Kraniektomie eine

Verbesserung des regionalen zerebralen Blutflusses (rCBF) der ischämischen Hemisphäre erreicht. Zusätzlich konnte nach durchgeführter Kraniektomie, eine verbesserte zerebrale Oxygenierung mittels Licox-Sonde gemessen werden, was die bereits erwähnten Effekte einer verbesserten ipsilateralen Durchblutung stützt. (Engelhorn et al. 2003; Hofmeijer et al. 2004; Gruber et al. 2008; Jaeger et al. 2003, Stiefel et al. 2004; Reithmeier et al. 2005; Doerfler et al. 2002).

Neben der möglicherweise verbesserten leptomenigealen Versorgung muss auch ein möglicher Kompressionseffekt auf die Perfusion auf Kapillarebene berücksichtigt werden. Denn durch die thrombotische Verlegung kommt es zwar zu einem Perfusionsdefizit, jedoch muss davon ausgegangen werden, dass durch das komprimierende vasogene Ödem ein kapilläre Minderversorgung erzeugt wird, wodurch es zu einer zusätzlichen Schädigung des Hirngewebes kommt (Walberer et al. 2007; Gerriets et al. 2009).

Neben der dekompressiven Hemikraniektomie sind in der Vergangenheit auch eine Reihe pharmakologischer Ansätze zur Behandlung des vasogenen Hirnödems untersucht worden (Bardutzky et al. 2007). Unter anderem können Osmotherapeutika wie Mannitol (Diringer et al. 2004), Glycerol (Hofmeijer et al. 2003) und die hyperosmolare Kochsalzlösung (Schwarz et al. 2002) durch eine Erhöhung des onkotischen Drucks im Extrazellulärraum Wasser aus dem Intrazellulärraum entfernen und somit das Ödem reduzieren (Green 2008; Bardutzky et al. 2007). Andere Verfahren, wie der Einsatz von Steroiden (Gomes et al. 2005), Albumin (Belayev et al. 2001) oder Indometacin (Schwarz et al. 1999) zielen auf eine direkte Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke ab. Hingegen bewirken die Hyperventilation und die Gabe von Puffern durch die Elimination von CO₂ eine Vasokonstriktion und darüber zu einer Abnahme des intrakraniellen Blutvolumens hirndrucksenkend (Green 2008; Bardutzky et al. 2007). Von den genannten pharmakologischen Verfahren werden im klinischen Alltag primär die Behandlung mit Osmotherapeutika zur Hirndrucktherapie eingesetzt.

Bei einigen tierexperimentellen Studien wurden beispielsweise ödem- und infarktreduzierende Wirkungen von Albumin beschrieben (Belayev et al. 1999, 2001; Liu et al. 2001). Allerdings wurden beide Wirkungen nicht getrennt voneinander untersucht, was lediglich durch Anwendung der bilateralen Kraniektomie möglich wäre. Derzeit läuft eine klinische Phase III-Studie (ALIAS-2), nachdem die Pilotstudie (ALIAS-1) einen Trend zu einem signifikant verbesserten klinischen Outcome durch Albumin präsentieren konnte (Hill et al. 2011). Gleiches gilt für die Anwendung von Osmotherapeutika- die wie bereits erwähnt die einzige leitliniengerechte-pharmakologische Option des Hirndrucks darstellen.

So wurden in tierexperimentellen Studien (Paczynski et al. 1997; Toung et al. 2002, 2005; Treadwell et al. 2010) sowohl die ödem- als auch die neuroprotektiven Effekte untersucht und beschrieben, jedoch wurden beide Wirkungen bisher nicht separiert untersucht. Möglicherweise wirken eine Reihe von Substanzen "sekundär" neuroprotektiv auf die Infarktgröße, jedoch fehlen gegenwärtig Studien, die dies evaluieren.

Dass die Unterscheidung zwischen "primärer" und "sekundärer" Neuroprotektion sinnvoll ist lässt sich u.a. auch am Beispiel der neuroprotektiven Wirkung von intravenösen Immunglobulinen belegen (Walberer et al. 2009). Nachdem Arumugam et al. (2007) in einem Mausmodell nachweisen konnte, dass die intravenöse Verabreichung von Immunglobulinen einen neuroprotektiven Effekt aufweist (Arumugam et al. 2007), zeigten Walberer et al. (2009) mit Hilfe der bilateralen Kraniektomie, dass die Neuroprotektion nicht durch Ödemreduktion bedingt ist. Immunglobuline führten in dieser Studie sowohl bei kraniektomierten als auch bei nicht-operierten Tieren zu einer Infarktgrößenreduktion. Daher ist der Effekt auf das Läsionsvolumen im Sinne von primärer Neuroprotektion erklärbar, vermutlich durch Einflüsse auf die durch das Komplementsystem mediierten Nervenzellschädigung (Walberer et al. 2009, Arumugam et al. 2007).

"Sekundäre Neuroprotektion" durch RNase

In Experiment IV konnten die Ergebnisse von Fischer et al. (2007) reproduziert werden und der Nachweis gelang, dass durch die Applikation von RNase eine signifikante Reduktion des vasogenen Ödems und des Infarktvolumens möglich ist (Fischer et al. 2007). Die Quantifizierung des Ödems mittels Nass-Trocken-Methoden und Mittellinienverlagerung kann durch große Infarktareale falsch beurteilt werden, denn größere Infarkte gehen mit einem größeren Ödem einher. Unabhängig von der Infarktgröße können jedoch in „regions-of-interest“ T2-Relaxationszeiten bestimmt werden, die eine konkrete Aussage über den zerebralen Wassergehalt zulassen (Gerriets et al. 2004). Diese Ergebnisse stützten die Resultate der Nass-Trocken-Untersuchung und der Mittellinienverlagerung, wodurch RNase eine ödemprotektive Wirkung besitzt. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt nicht differenziert werden, ob die ebenfalls festgestellte Reduktion des Infarktvolumens auf die Ödemprotektion zurückzuführen ist.

Der Nachweis der „eigentlichen“ Wirkung der RNase musste somit in einem Modell überprüft werden, in dem der mechanische Raumforderungseffekt des anschwellenden Hirngewebes „virtuell“ eliminiert wurde. Wie in Versuch I dargestellt, gelingt dies effektiv mit der neu entwickelten Technik der bilateralen Kraniektomie.

Mit Experiment V wurde der neuroprotektive Effekt von RNase bei kraniektomierten

Versuchstieren überprüft. Hierbei stellte sich zwar heraus, dass RNase erneut eine Reduktion des vasogenen Ödems bewirkt, was durch die T2-Relaxationszeiten und die Nass-Trocken-Untersuchung bewiesen ist. Überraschenderweise ist keine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens möglich. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass RNase zwar keinen direkten neuroprotektiven Effekte besitzt, jedoch durch die Ödemprotektion eine indirekte („sekundäre“) Neuroprotektion erwirkt. Das Potential, welches die Methode der sekundären Neuroprotektion birgt verdeutlicht das Experiment von Walberer et al. (2008). Ihre Studie konnte zeigen, dass eine Kraniektomie vor Infarktbeginn zu einer Infarktgrößenreduktion von rund 50% führt (Walberer et al. 2008). Im klinischen Alltag wird sich dieses Potential jedoch nur bei großen Infarkten mit entsprechendem Raumforderungseffekt effektiv nutzen lassen. Patienten mit kleinen territorialen oder gar lakunären Infarkten können davon nicht profitieren.

Bedeutung der vorliegenden Daten für die Planung zukünftiger klinischer Neuroprotektionsstudien

Mit der vorliegenden Untersuchung wird erstmals ein Verfahren beschrieben, mit dem zwischen "primärer" und "sekundärer" Neuroprotektion unterscheiden werden kann. Bisher ist der Mechanismus der "sekundären Protektion" folglich nur für RNase belegt. Da bei zahlreichen Substanzen aber gleichzeitig ödem- und neuroprotektive Effekte belegt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass zumindest bei einigen Verbindungen die Wirksamkeit ganz oder teilweise auf einem sekundären Mechanismus beruht. Für die Planung klinischer Studien wäre diese Information essentiell, da sekundär wirksame Neuroprotektiva bei Patienten mit kleinen oder mittleren Infarktgrößen in Ermangelung eines nennenswerten Raumforderungseffekts nicht wirken können. Beim Betrachten klinischer Neuroprotektionsstudien fällt auf, dass Patienten mit ausgedehnten Infarkten durch entsprechende Kriterien zumeist ausgeschlossen werden. Typischerweise werden die Ein- bzw. Ausschlusskriterien anhand der NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) formuliert. Die NIHSS dient der Beurteilung des Schweregrades, d.h. der klinischen Ausprägung des ischämischen Insults. Je höher die Punktzahl, umso schwerwiegender ist der Infarkt, wobei die Maximalpunktzahl 42 beträgt (Brott et al. 1989). So wurden die Einschlusskriterien bezüglich der NIHSS in der 2008 veröffentlichten DIAS-II Studie mit vier bis 24 Punkten definiert. Diese klinische Studie sollte die thrombolytische Wirksamkeit von Desmoteplase bei Schlaganfallpatienten überprüfen (Hacke et al. 2009). In einer weiteren großen multizentrischen Studie (SAINT I + II) wurde die klinische Wirkung des freien Radikalfängers NXY-059 bei weit über 4500 Patienten getestet. Hierbei betrug der

durchschnittliche NIHSS ungefähr 12, was eher einem kleinen bis mittelgroßen Infarkt entspricht (Diener et al. 2008). Ein weiterer Beleg, dass in klinischen Studien kaum schwerwiegende, raumfordende Infarkte miteinbezogen werden, kann anhand der durchschnittlich gemessenen Infarktgröße dargestellt werden. So wurde in einer klinischen Überprüfung hinsichtlich der Wirksamkeit von Erythropoetin im akuten Schlagfall mit über 500 Patienten ein durchschnittliches Läsionsvolumen von $39 \text{ cm}^3 \pm 55$ bei Erythropoetin-behandelten Patienten registriert und in der Placebogruppe lag das durchschnittliche Läsionsvolumen bei $36 \text{ cm}^3 \pm 59$. In beiden Versuchsarmen sind somit keine großen raumfordenden Infarkte eingeschlossen worden (Ehrenreich et al. 2009).

Auf Grund dieser strikten Vorabselektion durch die Studiendesigns in klinischen Studien werden offensichtlich nur sehr wenige Patienten einbezogen, die von einem großen, raumfordenden Infarkt im Sinne eines malignen Mediainfarkts betroffen sind - obwohl in der Realität ungefähr fünf bis zehn Prozent aller Schlaganfallpatienten einen solchen lebensbedrohlichen Mediainfarkt erleiden (Hacke et al. 1996). Daher wäre vermutlich in den oben genannten Studien der Effekt der sekundären Neuroprotektion nicht zur Entfaltung gekommen, da die meisten Infarkte in den klinischen Studien große raumfordende Infarkte ausschließen, so dass keine Ödemreduktion im Sinne einer sekundären Neuroprotektion erreicht würde.

Für das Design künftiger klinischer Neuroprotektionsstudien wäre daher in Ergänzung zu den STAIR-Kriterien (Stroke Therapy Industry Roundtable 1999; Fisher et al. 2007) zu fordern, dass im Vorfeld eine präklinische Testung auf "primäre" bzw. "sekundäre" Neuroprotektion erfolgt und dass sekundär wirksame Pharmaka ausschließlich bei Patienten mit raumfordernden Hirninfarkten zum Einsatz kommen.

V Zusammenfassung

Der Schlaganfall gehört zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt und verursacht die meisten Behinderungen. Dementsprechend kommt dieser Erkrankung eine besondere sozioökonomischen Bedeutung zu.

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Arten von Schlaganfällen unterschieden: Am häufigsten (85%) treten thrombotisch bzw. embolische Hirninfarkte auf. Lediglich 15% aller Schlaganfälle sind hämorrhagischen Ursprungs. Bei Hirninfarkten kommt es zu einer Minderperfusion, die bei länger anhaltender Ischämie zu einem irreversiblen Zelluntergang führt. Dieser breitet sich im Versorgungsgebiet der verschlossenen Hirnarterie binnen weniger Stunden zentrifugal aus. Somit befindet sich im Randbereich dieses Areales für eine begrenzte Zeit kritisch minderperfundiertes aber noch vitales Hirngewebe die sogenannte „Penumbra“. Dieses Gewebe ist revaskularisierenden oder anderen neuroprotektiven Therapieformen zugänglich.

Während ischämischen Zellunterganges laufen eine Reihe komplexer pathophysiologischer Prozesse ab, die als „postischämische Kaskade“ bezeichnet werden. Diese Kaskade ist pharmakologisch beeinflussbar, was die Möglichkeit einer breit anwendbaren pharmakologischen Neuroprotektion eröffnet. Zahlreiche Wirkstoffe führen im Tierexperiment tatsächlich auch zu einer Infarktgrößenreduktion, scheiterten bisher jedoch bisher ausnahmslos in klinischen Studien. Somit steht derzeit als einzige kausale Therapie des Hirninfarkts die frühe Rekanalisation (systemische oder lokale Thrombolyse) zur Verfügung. Auf Grund des beschränkten Zeitfensters von 4,5h nach Ischämiebeginn und zahlreicher Kontraindikationen können jedoch nur wenige Patienten von diesen Verfahren profitieren.

Die vorliegende Arbeit widmet sich einem alternativen Therapieansatz zur neuroprotektiven Akutbehandlung des Hirninfarkts, der auf der Reduktion des begleitenden Hirnödems basiert. Letzteres stellt eine schwerwiegende Komplikation des Schlaganfalls dar und führt bei zahlreichen Patienten zum Tod durch zerebrale Herniation ("maligner Mediainfarkt") oder zu erheblichen Beeinträchtigungen des Outcome durch druckbedingte Kollateralschäden.

Die operative Behandlung des ausgeprägten Hirnödems durch eine Hemikraniektomie, d.h. die operative Entfernung eines Teils der Schädelkalotte zur Druckentlastung, ist mittlerweile klinisch etabliert und dient primär der Verhinderung der zerebralen Herniation. Möglicherweise bewirkt eine frühzeitige operative Entlastung aber auch eine

Verminderung druckbedingter Kollateralschäden und damit eine Infarktgrößenreduktion (sog. "sekundäre Neuroprotektion"). Tierexperimente belegen, dass eine extrem frühzeitige operative Dekompression bei ausgedehnten Hirninfarkten zu einer Infarktgrößenreduktion von bis zu 50% führen kann.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, ob ein ähnlicher neuroprotektiver Effekt durch eine *pharmakologische* Verminderung des vasogenen Hirnödems erzielbar ist.

Hierzu war zunächst die Entwicklung und Evaluation eines Tiermodells notwendig, welches eine getrennte Betrachtung von "primärer Neuroprotektion" (Infarktgrößenreduktion z.B. durch Eingriffe in die postischämische Kaskade) und "sekundärer Neuroprotektion" (Infarktgrößenreduktion durch Verminderung von ödembedingten Kompressionseffekten) erlaubt. Dazu wurde das Modell der "bilateralen Kraniektomie" entwickelt, welches eine fast vollständige Elimination der Druckwirkung des vasogenen Hirnödems erlaubt. Mit diesem Rattenmodell können Hirninfarkte erzeugt werden, die wahlweise zu ödembedingten Kompressionseffekten führen (sham-operierte Tiere) oder diese verhindern (Kraniektomie-Tiere).

Mit diesem Modell wurden die neuroprotektiven Eigenschaften von RNase getestet. Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass Hirninfarkte zur lokalen Freisetzung von RNA führen, was zu einer VEGF-medierten Schädigung der Blut-Hirnschranke führt. Die Behandlung mit RNase kann diesen Effekt *in vitro* und auch im Tiermodell unterdrücken und führt bei Nagern zu einer Verminderung des vasogenen Ödems und der Infarktgröße.

Kern-Experiment der vorliegenden Arbeit war eine Studie, in der RNase sowohl im Kraniektomie-Modell als auch im Sham-Modell gegen Placebo getestet wurde. Dabei führte die RNase-Behandlung in beiden Modellen zu einer drastischen Verminderung des vasogenen Hirnödems. Diese bewirkte aber lediglich in der Sham-Gruppe eine Verminderung des Hirninfarktolumens, nicht jedoch in der Kraniektomiegruppe.

Diese Daten belegen, dass die infarktgrößenreduzierende Wirkung von RNase auf einer Verminderung ödembedingten Druckwirkung und nicht auf einer direkten Neuroprotektion basiert. Damit ist erstmals der Nachweis einer "sekundären" pharmakologischen Neuroprotektion gelungen.

Die vorliegenden Erkenntnisse haben Bedeutung für das Design zukünftiger klinischer Neuroprotektionsstudien. Entsprechende Substanzen sollten präklinisch auf das Vorhandensein "primärer" oder "sekundärer" Neuroprotektionseffekte getestet werden. Wirkt ein Medikament überwiegend über "sekundäre" Mechanismen, d.h. ödemreduzierend, können sie nur bei ausgedehnten Infarkten, mit erheblichem

Begleitödem, wirken. Durch die Wahl der Ein- und Ausschlusskriterien sollte in diesen Fällen sichergestellt werden, dass nur Patienten eingeschlossen werden, die von dieser Substanz auch profitieren können.

VI Summary

Stroke is the second leading cause of death and the most frequent cause of disabilities among adults in the western world. Thus, this disorder is of utmost socio-economic relevance.

Basically, two different types of stroke are recognised: thrombotic and/or embolic cerebral infarctions occur most often (85%), while 15% of all strokes are of haemorrhagic origin. Cerebral infarction is related to inadequate cerebral perfusion, which can lead to irreversible cell deterioration. The area of cell death expands centrifugally within the territory of the occluded artery during the first few hours. Within this time-frame, a certain amount of critically hypoperfused but still viable brain tissue exists, which is referred to as the "penumbra". This tissue is potentially receptive to revascularisation or neuroprotective treatment.

Ischemic cell death is caused by a highly complex chain of different patho-physiological processes which is referred to as the "postischaemic cascade". This cascade can be influenced pharmacologically, which opens the opportunity for widely applicable pharmacological neuroprotection. Numerous drugs have been proven to reduce infarct size in animal studies. However, these drugs have invariably failed without exception in clinical trials. Thus, revascularisation (i.e. systemic or local thrombolysis) is the only currently available causal therapy for ischemic stroke. Unfortunately, only very few patients are suitable for this treatment due to the narrow time-window (4.5 hours after onset of ischemia) and numerous contra-indications.

The present work addresses an alternative therapeutic approach towards neuroprotection in the setting of acute cerebral infarction that is based on the diminution of the accompanying cerebral oedema. The latter represents a severe complication of ischemic stroke and frequently leads to death, caused by cerebral herniation ("malignant middle cerebral arterial stroke"), or considerably impairs functional outcome due to pressure-related collateral damage.

Hemicraniectomy represents a surgical approach towards life-threatening brain edema. During this procedure, a large part of the calvarium is removed surgically in order to reduce intracranial pressure. This treatment option has recently become established and basically aims at preventing cerebral herniation. However, clinical data suggest that timely surgery might provide also a diminution of pressure-related collateral damages and thus a reduction in infarct-size (so-called "secondary neuroprotection"). Animal experiments prove

that extremely early surgical decompression of large territorial ischemic stroke can reduce infarct size by up to 50%.

The present study was designed to evaluate whether a similar neuroprotective effect is achievable by means of *pharmacological* treatment of vasogenic oedema formation.

For this purpose development of an animal model was necessary, which would facilitate a separate evaluation of primary neuroprotection (infarct size reduction, e.g. by means of interventions into the post-ischemic cascade) and secondary neuroprotection (infarct size reduction by means of alleviation of oedema related compression effects). Thus, the model of “bilateral craniectomy” was developed, which enables an almost complete elimination of pressure effects due to vasogenic cerebral oedema. By using this rat model, cerebral infarcts can be generated, that can optionally cause (sham-operated animals) or avoid (craniectomy animals) oedema-related compression effects.

The neuroprotective characteristics of RNase were tested using this model. Previous experiments indicated that cerebral infarcts lead to local release of RNA, which leads to VEGF-mediated (vascular endothelial growth factor) damage to the blood-brain barrier. Treatment with RNase can suppress this effect in vitro as well as in animal models and leads to an alleviation of the vasogenic oedema and the infarct size in rodents.

Core experiment of the present work was a study, in which RNase was tested in both, the craniectomy model as well as the sham model against a placebo. As expected, RNase-treatment resulted in a drastic alleviation of the vasogenic cerebral oedema in both models. Reduction of infarct volume, however, was detected only in the sham-group, but not in the craniectomy-group.

These data confirm that the infarct size-reducing effect of RNase is attributable to the alleviation of oedema-related pressure effects and not caused by direct neuro-protection. Thus, the present study is the first proof of the concept of pharmacological “secondary” neuroprotection.

The findings from this study might be of importance for the design of future clinical neuroprotection trials. Neuroprotective drugs should be tested in a preclinical setting in order to determine whether or not they exhibit a “primary” or “secondary” neuroprotective potential. If a drug takes effect primarily through “secondary” mechanisms (i.e. oedema-reduction), it can only be effective for large territorial infarcts with severe accompanying oedema. Selection of in- and exclusion criteria should therefore assure that only patients with large infarcts, who in fact can benefit from the neuroprotective drug, shall be included in clinical trials.

VII Literaturverzeichnis

1. Abbott NJ et al. Astrocyte–endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:41–53.
2. Ahmed N, Wahlgren N, Brainin M, Castillo J, Ford GA, Kaste M, et al. Relationship of blood pressure, antihypertensive therapy, and outcome in ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis: retrospective analysis from Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-International Stroke Thrombolysis Register (SITS-ISTR). *Stroke* 2009; 40:2442-2449.
3. Angel I, Strein S, Schatz G, Krakovsky M, Finkelstein E, Dvir E, et al. The lipophilic transition modulator DP-b99 attenuates matrix metalloproteinase activity in a rat MCAO ischaemic model. *Soc Neurosci Abstract* 2004; 100:3.
4. Arumugam TV, Tang SC, Lathia JD, Cheng A, Mughal MR, Chigurupati S, Magnus T, Chan SL, Jo DG, Ouyang X, Fairlie DP, Granger DN, Vortmeyer A, Basta M, Mattson MP. Intravenous immunoglobulin protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:14104–14109.
5. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. The Role of Inflammation and Cytokines in Brain Injury. *Neurosci Biohav Rev* 1996; 20:445-452.
6. Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase- 9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; 21:7724–7732.
7. Asano T, Mori T, Shimoda R, Shinagawa R, Satoh S, Yada S, et al. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocyte overproduction of S100a. *Curr Drug Targets-CNS & Neurol Dis* 2005; 4:127–142.
8. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in Cerebral Ischemia – The Ischemic Penumbra. *Stroke* 1981; 12:723-725.

9. Back Z, Kohno K, Hossmann KA. Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCL-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation and electro-encephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14:12-19.
10. Baethmann A. Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg Rev* 1978; 1:85-100.
11. Bardutzky J, Schwab S. Antiedema therapy in ischemic stroke. *Stroke* 2007; 38: 3084–3094.
12. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor-alpha—a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28:1233–1244.
13. Belayev L, Zhao W, Pattany PM, Weaver RG, Huh PW, Lin B, Busto R, Ginsberg MD. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging confirms marked neuroprotective efficacy of albumin therapy in focal cerebral ischemia. *Stroke* 1998; 29: 2587–2599.
14. Belayev L, Liu Y, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Human albumin therapy of acute ischemic stroke: marked neuroprotective efficacy at moderate doses and with a broad therapeutic window. *Stroke* 2001; 32: 553–560.
15. Berezcki D, Liu M, do Prado GF, et al. Mannitol for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1):CD001153.
16. Berrouschot J, Sterker M, Bettin S, Koster J, Schneider D. Mortality of space-occupying (malignant) middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med* 1998; 24:620–623.
17. Block F, Schwarz M. Neuroprotektion beim Schlaganfall. Eine kritische Bestandsaufnahme. *Nervenarzt* 1999; 70:101-110.
18. Block F, Schwarz M. Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res* 1996; 741:153–159.

19. Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2009, 1:8.
20. Brott et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20:864-870.
21. Buecheler E, Lackner KJ, Thelen M. Einführung in die Radiologie-Diagnostik und Interventionen. Thieme-Verlag; 2006; 11:34-39.
22. Carandang RA, Krieger DW. Decompressive hemicraniectomy and durotomy for malignant middle cerebral artery infarction. *Neurocrit Care* 2008; 8:286–289.
23. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7:357-368.
24. Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. Recombinant tissue-type plasminogen activator (alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventiona. Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA* 1999; 282:2019–2026.
25. Davalos A, Toni D, Iweins F, et al. Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European cooperative acute stroke study (ECASS) I. *Stroke* 1999; 30:2631– 2636.
26. De Freitas G, Bogousslavsky J. Classification of stroke. *Imaging in stroke*. London–Chicago: Remedica 2003; 1–17.
27. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255:989-991.
28. Del Zoppo GJ, Milner R. Integrin–matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1966–1975.

29. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien 2009.
30. Di X, Bullock R, Watson J, Fatouros P, Chenard B, White F, et al. Effect of CP101,606, a novel NR2B subunit antagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, on the volume of ischaemic brain damage and cytotoxic brain edema after middle cerebral artery occlusion in the feline brain. *Stroke* 1997; 28:2244–2251.
31. Diedler J, Köhrmann M, et al. Behandlung schwerster Schlaganfälle auf der Intensivstation Maligner Mediainfarkt – intrazerebrale Blutung –Subarachnoidalblutung. *Notfall Rettungsmed* 2008; 11:183–189.
32. Diedler J, Sykora M, Blatow M, Juttler E, Unterberg A, Hacke W. Decompressive surgery for severe brain edema. *J Intensive Care Med* 2009; 24:68–78.
33. Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hårdemark HG, Rodichok L. SAINT I and II Investigators. NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 2008; 39:1751–1758
34. Diringner MN, Zazulia AR. Osmotic therapy: Fact and fiction. *Neurocrit Care* 2004; 1:219 –233.
35. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-397.
36. Doerfler A, Engelhorn T, Heiland S, Benner T, Forsting M. Perfusion- and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for monitoring decompressive craniectomy in animal with experimental hemispheric stroke. *J Neurosurg* 2002; 96:933–940.
37. Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M. Combination of decompressive craniectomy and mild hyperthermia ameliorates infarction volume after permanent Focal ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32:2675–2681.

38. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-1039.
39. Eckert B. Acute stroke therapy 1981–2009. *Klin Neuroradiol* 2009; 9:8–19.
40. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, Schellinger PD, Bohn M, Becker H, Wegrzyn M, Jahnig P, Herrmann M, Knauth M, Bahr M, Heide W, Wagner A, Schwab S, Reichmann H, Schwendemann G, Dengler R, Kastrup A, Bartels C. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40:647-656.
41. Engelhorn T, Kastrup A, Beaulieu C, de Crespigny A, Forsting M, Moseley ME, Faraci FM. Decompressive craniectomy, reperfusion, or a combination for early treatment of acute "malignant" cerebral hemispheric stroke in rats? Potential mechanisms studied by MRI. *Stroke* 1999; 30:1456-1463.
42. Engelhorn T, Doerfler A, de Crespigny A, Beaulieu C, Forsting M, Moseley ME: Multilocal magnetic resonance perfusion mapping comparing the cerebral hemodynamic effects of decompressive craniectomy versus reperfusion in experimental acute hemispheric stroke in rats. *Neurosci Lett* 2003; 344:127–131.
43. Engelhorn T, Dörfler A, Egelhof T, Schwab S, Heiland S, Sartor K, et al. Follow-up monitoring with magnetic resonance tomography after de-compressive trephining in experimental "malignant" hemispheric infarct. *Zentralbl Neurochir* 1998; 59:157–165.
44. Engelhorn T, Heiland S, Schabitz WR, Schwab S, Busch E, Forsting M, et al. Decompressive craniectomy in acute cerebral ischemia in rats. Is there any benefit in smaller thromboembolic infarcts? *Neurosci Lett* 2004; 370:85–90.
45. Engelhorn T, von Kummer R, Reith W, Forsting M, Doerfler A. What is effective in malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* 2002; 33:617–622.
46. ESO-Guidelines: <http://www.eso-stroke.org/recommendations.php?cid=9&sid=1>

47. Faden AI, Stoica B. Neuroprotection: challenges and opportunities. *Arch Neurol* 2007; 64:794-800.
48. Feldman Z, Kanter MJ, Robertson CS, et al. Effect of head elevation on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure and cerebral blood flow in head-injured patients. *J Neurosurg* 1992; 76:207–211.
49. Fiebach JB, Schellinger PD. Moderne Kernspintechniken beim Schlaganfall. *Radiologe* 2003; 43:251–264.
50. Fisher M, Gerriets T: Cerebral neuroprotection, in Latchaw RE, Kucharczyk J, Moseley ME. *Imaging of the Nervous System: Diagnostic and Therapeutic Applications*. Philadelphia: Mosby Inc 2005; 1:453–462.
51. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007; 110:2457-2465.
52. Fisher M, Albers GW, Donnan GA, Furlan AJ, Grotta JC, Kidwell CS, Sacco RL, Wechsler LR. For the stroke therapy academic industry roundtable IV (STAIR-IV): Enhancing the development and approval of acute stroke therapies: stroke academic industry roundtable (STAIR)-IV. *Stroke* 2005; 36:1808-1813.
53. Fisher M. For the stroke therapy academic industry roundtable (STAIR): Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 2003; 34:1539-1546.
54. Fisher M, Hanley DF, Howard G, et al. Recommendations from the STAIR V meeting on acute stroke trials, technology and outcomes. *Stroke* 2007; 38:245–248.
55. Fisher M. New approaches to neuroprotective drug development. *Stroke* 2011; 42:24-27.

56. Friedrich C. Die Therapie RNA-induzierter Neurotoxizität mit RNase Evaluation eines neuen Konzepts zur Behandlung des akuten Hirninfarkts im Tiermodell. Humanmedizin-Promotionsschrift 2009.
57. Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz, Neumann-Haefekin T. Die Schlaganfallzahlen bis 2050. Dtsch Ärzteblatt 2008; 105:467-473.
58. Foerch C, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T. Future demographic trends in decrease the proportion of ischemic stroke patients receiving thrombolytic therapy:a call to set-up therapeutic studies in the very old. Stroke 2009; 40:1900-1902.
59. Forsting M, Reith W, Schabitz WR, et al. Decompressive craniectomy for cerebral infarction. An experimental study in rats. Stroke 1995; 26:259-264.
60. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, et al. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. Stroke 2004; 35:998–1004.
61. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, et al. Intraarterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. Jama 1999; 282:2003–2011.
62. Georgiadis D, Schwab S. Hypothermia in acute stroke. Curr Treat Options Neurol 2005; 7:119 –127.
63. Gerriets T, Stolz E, Mondrau B, Fiss I, Seidel G, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in hemispheric infarctions. Neurology 1999; 52:45-49.
64. Gerriets T, Stolz E, König S, Babacan S, Fiss I, Jauss M, Kaps M. Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: an early outcome predictor. Stroke 2001; 32: 442-447.
65. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. Stroke 2004; 35:566-571.

66. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 12:137-43.
67. Gerriets T, Walberer M, Ritschel N, Tschernatsch M, Mueller C, Bachmann G, Schoenburg M, Kaps M, Nedelmann M. Edema formation in the hyperacute phase of ischemic stroke. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2009; 111:1036-1042.
68. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C, Kluge A, Kaps M, Fisher M, Bachmann G. Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* 2004; 35:2372-2377.
69. Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke* 2009; 40:111-114.
70. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 thomas willis lecture. *Stroke* 2003; 34:214-223.
71. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 1994; 36:553-554.
72. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom From Failure. Lessons From Neuroprotective Stroke Trials and New Therapeutic Directions. *Stroke* 2002; 33:2123-2136.
73. Gomes JA, Stevens RD, Lewin JJ, et al. Glucocorticoid therapy in neurologic critical care. *Crit Care Med* 2005, 33:1214–1224.
74. Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153:325-338.

75. Green AR. Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29:1030-1034.
76. Gruber A, Dorfer C, Knosp E. Mediainfarkt und Kraniektomie. Derzeitige Studienlage, Operationsindikationen und organisatorische Aspekte. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 2008; 9:12–19.
77. Gupta R, Connolly ES, Mayer S, et al. Hemicraniectomy for massive middle cerebral artery territory infarction: a systematic review. *Stroke* 2004; 35:539–543.
78. Hacke W et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 2004; 363:768–774.
79. Hacke W, Furlan AJ, Al-Rawi Y, et al. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol* 2009; 8:141–150.
80. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359:1317–1329.
81. Hacke W, Kaste M, Olsen TS, et al. Empfehlungen der Europäischen Schlaganfall-initiative zur Versorgung und Behandlung des Schlaganfalles. *Notarzt* 2003; 19:25–31.
82. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, de Georgia M, von Kummer R. “Malignant” middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol* 1996; 53:309–315.
83. Hajat C, Hajat S, Sharma P. Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome: a meta-analysis of studies in patients. *Stroke* 2000; 31:410-414.
84. Hamann et al. Aktuelles zur Akutbehandlung und Prävention des Schlaganfalls, *Hessisches Ärzteblatt* 2010; 9:553-561.

85. Hamann G. Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiologe* 1997; 37:843-852.
86. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57:173–185.
87. Heiland S, Sartor K. Magnetresonanztomographie beim Schlaganfall-Methodische Grundlagen und klinische Anwendung. *Fortschr Röntgenstr* 1999; 171.
88. Henry PT, Chandy MJ. Effect of ascorbic acid on infarct size in experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in a primate model. *Acta Neurochir* 1998; 140:977-980.
89. Heuschmann PU, Neuhauser HK, Endres M. Entwicklung von Mortalität und Morbidität vaskulärer Erkrankungen-Unterschiede zwischen koronarer Herzerkrankung und Schlaganfall. *Nervenarzt* 2011; 82:145–152.
90. Hill MD, Martin RH, Palesch YY, Tamariz D, Waldmann BD, Waldmann BD, Ryckborst, Moy CS, Barsan WG, Ginsberg MD. The Albumin in Acute Stroke Part 1 Trial: an exploratory efficacy analysis. *Stroke* 2011; 42:1621-1625.
91. Hockenberry D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146:16-19.
92. Hoell T, Nagel M, Beier A, Oltmanns F, Kern BC, Mast H, Meisel HJ. Management schwerer Schädel-Hirn-Traumen mit Hilfe der dekompressiven Kraniektomie. *Trauma Berufskrankh* 2002, 4:14–18.
93. Hofmeijer J, Amelink GJ, Algra A, et al. Hemicraniectomy After Middle cerebral artery infarction with Life-threatening Edema Trial (HAMLET): protocol for a randomised controlled trial of decompressive surgery in space-occupying hemispheric infarction. *Trials* 2006; 7:29.
94. Hofmeijer J, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Kappelle LJ, Bar PR. Delayed decompressive surgery increases apparent diffusion coefficient and improves peri-

infarct perfusion in rats with space-occupying cerebral infarction. *Stroke* 2004; 35:1476–1481.

95. Hofmeijer J, van der Worp HB, Kappelle LJ. Treatment of space occupying cerebral infarction. *Crit Care Med* 2003, 31:617- 625.

96. Hoppe H, Ith M, Keller P. Magnetresonanztomographie (T2*) zur Messung der kardialen Eisenbelastung. *Schweiz Med Forum* 2010; 10:134–136.

97. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36:557-565.

98. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26:1057–1083.

99. Huttner B; Schwab S. Malignant middle cerebral artery infarction: clinical characteristics, treatment strategies, and future perspectives. *Lancet Neurology* 2009; 8:949-958.

100. Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 1996; 27:1373–1380.

101. Jaeger M, Soehle M, Meixensberger J. Effects of decompressive craniectomy on brain tissue oxygen in patients with intracranial hypertension. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:513–515.

102. Jonas S, Aiyagari V, Vieira D, Figueroa M. The failure of neuronal protective agents versus the success of thrombolysis in the treatment of ischemic stroke. The predictive value of animal models. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939:257-267.

103. Jüttler E, Schwab S, Schmiedek P, et al. Decompressive surgery for the treatment of malignant infarction of the middle cerebral artery (DESTINY): a randomized, controlled trial. *Stroke* 2007; 38:2518–2525.

104. Jüttler E, Schellinger D, Aschoff A, Zweckberger K, Unterberg A and Hacke W, Clinical review: Therapy for refractory intracranial hypertension in ischaemic stroke. *Critical Care* 2007; 11:231
105. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104:6388-6393.
106. Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang X, Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* 1991; 22:1032-1039.
107. Katsuta K, Nakanishi H, Shirakawa K, Yoshida K, Takagi K, Tamura A. The neuroprotective effect of the novel noncompetitive NMDA antagonist, FR115427, in focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15:345–348.
108. Kempinski O. Hypertonic saline and stroke. *Crit Care Med* 2005; 33:259–260.
109. Klein G. Stentimplantation zur Behandlung intrakranieller Stenosen. *Z Gefäßmed* 2007; 4: 4–10.
110. Koehler RC et al. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* 2006; 100: 307–317.
111. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: 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.
112. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU. Inzidenz, Ätiologie und Langzeitprognose des Schlaganfalls. *Fortschritte der Neurologie und Psychiatrie* 2002; 70:657-662.
113. Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Gassmann KG, Lang E, Ritter von Stockert TH. A

prospective community-based study of stroke in Germany: The Erlangen Stroke Project (ESPro). Incidence and case fatality at 1, 3 and 12 months. *Stroke* 1998; 29:2501-2506.

114. Kucinski T, Fiehler J, Zeumer H. Bildgebung und Pathophysiologie des frühen ischämischen Ödems beim akuten Schlaganfall. *Clin Neuroradiol* 2005; 15:63–173.

115. Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1995; 26:1655-1658.

116. Langhorne P, Pollock A: What are the components of effective stroke unit care? *Age Ageing* 2002; 31:365-371.

117. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions – Examples employing nuclear magnetic-resonance. *Nature* 1973; 242:190–192.

118. Lee KR, Colon GP, Betz AL, et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg* 1996; 84:91–6.

119. Lehrner J, Pusswald G, Fertl E, Strubreither W, Kryspin-Exner I. Klinische Neuropsychologie. Grundlagen – Diagnostik – Rehabilitation. Springer-Verlag; 2006:205-216.

120. Lichy C, Hacke W. Schlaganfall. *Internist* 2010; 51:1003–1012.

121. Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke* 2003; 34:2279–2284.

122. Liebetrau M, Huewel J, Meyding-Lamade U, Weidauer S, Schuetz HJ, Bass H, Steinmetz H, Hamann GF. Aktuelles zur Akutbehandlung und Prävention des Schlaganfalls. *Hessisches Ärzteblatt* 2010; 71:553–561.

123. Lin JY, Chung SY, Lin MC, Cheng FC. Effects of magnesium sulphate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dual-probe microdialysis technique. *Life Sci* 2002; 71:803–811.

124. Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Belayev A, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol* 2001; 428:193–201.
125. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20:84-91.
126. Mansfield P, Grannell PK. NMR diffraction in solids. *J Physics C Solid State* 1973; 6:422–426.
127. Maher J, Hachinski V. Hypothermia as a potential treatment for cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1993; 5:277-300.
128. Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg G. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 1998; 29:2171-2180.
129. Marion DW, Puccio A, Wisniewski SR, Kochanek P, Dixon CE, Bullian L, Carlier P. Effect of hyperventilation on extracellular concentrations of glutamate, lactate, pyruvate, and local cerebral blood flow in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2002; 30:2619–2625.
130. Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull* 2009; 92:7–32.
131. Mauler F, Horvath E. Neuroprotective efficacy of repinotan HCl, a 5-HT_{1A} receptor agonist, in animal models of stroke and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:451–459.
132. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 1993; 73:421-424.

133. Milhaud D, Thouvenot E, Heroum C, Escuret E. Prolonged moderate hypothermia in massive hemispheric infarction: Clinical experience. *J Neurosurg Anesthesiol* 2005; 17:49-53.
134. Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, Wendland MF, Weinstein PR. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med* 1990; 14:330-346
135. Morley NC, Berge E, Cruz-Flores S, Whittle IR. Surgical decompression for cerebral oedema in acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 3:CD003435.
136. Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363:439–445
137. Muizelaar JP, Marmarou A, Ward JD, Kontos HA, Choi SC, Becker DP, Gruemer H, Young HF. Adverse effects of prolonged hyperventilation in patients with severe head injury: A randomized clinical trial. *J Neurosurg* 1991; 75:731–739.
138. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1436-1442.
139. Nagao S, Kitaoka T, Fujita K, Kuyama H, Ohkawa M. Effect of tris- (hydroxymethyl)-aminomethane on experimental focal cerebral ischemia. *Exp Brain Res* 1996; 111:51–56.
140. Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J* 2005; 385:831-838.
141. Nedergaard M. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 1996; 71:75-83.

142. Nolan JP, Morley PT, Vaden Hoek TL, Hickey RW. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the advanced life support task force of the international liaison committee on resuscitation. *Circulation* 2003; 108:118–121.
143. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307:462–465.
144. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horkey LL, Worp BH van der, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006, 59:467-77.
145. Oliff HS, Weber E, Eilon G, Marek P. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* 1995; 675:20-26.
146. Oldendorf H et al. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1977; 1:409–417.
147. Osuga H, Hakim AM. Relevance of interstitial glutamate to selective vulnerability in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14:343-347.
148. Ovbiagele B, Kidwell CS, Starkman S, Saver JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3:9-20.
149. Paciaroni M, Arnold P, Van Melle G, et al. Severe disability at hospital discharge in ischemic stroke survivors. *Eur Neurol* 2000; 43:30–34.
150. Paczynski RP, He YY, Diringer MN, et al. Multiple-dose mannitol reduces brain water content in a rat model of cortical infarction. *Stroke* 1997; 28:1437–1443.
151. Padosch SA, Vogel P, Böttiger BW. Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. *Anaesthesist* 2001; 50:905-920.

152. Park J, Kim E, Kim GJ, Hur YK, Guthikonda M. Externaldecompressive craniectomy including resection of temporal muscle and fascia in malignant hemispheric infarction. *J Neurosurg* 2009; 110:101–105.
153. Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middlecerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:196-205.
154. Preissner K. Extracellular RNA-A new player in blood circulation and vascular permeability. *Hämostaseologie* 2007; 27:373–377.
155. Pullicino PM, Alexandrov AV, Shelton JA, Alexandrova NA, Smurawska LT, Norris JW. Mass effect and death from severe acute stroke. *Neurology* 1997; 49:1090-1095.
156. Reith J, Jörgensen HS, Pedersen PM, Nakayama H, Raaschou HO, Jeppesen LL, Olsen TS. Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome. *Lancet* 1996; 347:422-425.
157. Reithmeier T, Lohr M, Pakos P, Ketter G, Ernestus RI. Relevance of ICP and ptiO(2) for indication and timing of decompressive craniectomy in patients with malignant brain edema. *Acta Neurochir* 2005; 147:947–952.
158. Relton JK, Rothwell NJ. Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1992; 5:178–198.
159. Rieke K, Schwab S, Krieger D, et al. Decompressive surgery in space- occupying hemispheric infarction: results of an open, prospective trial. *Crit Care Med* 1995; 23:1576-1587.
160. Righetti E, Celani MG, Cantisani T, Sterzi R, Boysen G, Ricci S. Glycerol for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD000096.
161. Robertson SC, Lennarson P, Hasan DM, Traynelis VC. Clinical course and surgical management of massive cerebral infarction. *Neurosurgery* 2004; 55: 55–61.

162. Rogalewski A, Schäbitz W. Entwicklungen neuer Therapiemöglichkeiten des Schlaganfalls. Perspektive für Neuroprotektiva? *Nervenarzt* 2008; 79:218-224.
163. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, et al. Heart disease and stroke statistics 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation* 2007; 115:69-171.
164. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 2007; 22:E4.
165. Safar P. Cerebral resuscitation after cardiac arrest: research initiatives and future directions. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 324-349.
166. Sakamoto N K, Kato H, Ohtomo H. Disturbed Ca²⁺ homeostasis in the gerbilhippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* 1986; 364:372- 376.
167. Salom JB, Perez-Asensio FJ, Burguete MC, Marin N, Pitarch C, Torregrosa G, et al. Single-dose ebselen does not afford sustained neuroprotection to rats subjected to severe focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 2004; 495:55–62.
168. Sander D, Etgen T. Sekundärprophylaxe des Schlaganfalls nach PROFESS und SPARCL. *Der Internist* 2009; 50:1227-1238.
169. Sandercock PA, Counsell C, Tseng MC. Low-molecular-weight heparins or heparinoids versus standard unfractionated heparin for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; CD000119.
170. Sandoval K, Witt K. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease* 2008; 32:200–219.
171. Saposnik G, Kapral MK, Coutts SB, Fang J, Demchuk AM, Hill MD. Do all age groups benefit from organized inpatient stroke care? *Stroke* 2009; 40:3321-3327.

172. Sarov M, Guichard JP, Chibarro S, Guettard E, Godin O, Yelnik A, George B, Bousser MG, Vahedi K. Sinking skin flap syndrome and paradoxical herniation after hemicraniectomy for malignant hemispheric infarction. *Stroke* 2010; 41:560–562.
173. Savitz SI, Fisher M. Future of Neuroprotection for Acute Stroke: In the Aftermath of the SAINT Trials. *Ann Neurol* 2007; 61:396-402.
174. Scarcella G. Encephalomalacia simulating the clinical and radiological aspects of brain tumor; a report of 6 cases. *J Neurosurg* 1956; 13:278–292.
175. Schabitz WR, Fisher M. Perspectives on neuroprotective stroke therapy. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:1271–1276.
176. Schneider F, Fink GR. Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie. Springer-Verlag 2007; 1:61-78.
177. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced VEGF expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 2002; 125:2549-2557.
178. Schwab S, Erbguth F, et al. „Paradoxe Herniation“ nach Entlastungstrepanation. *Nervenarzt* 1998; 69:896–900.
179. Schwab S, Georgiadis D, Berrouschot J, Schellinger PD, Graffagnino C, Mayer SA. Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. *Stroke* 2001; 32:2033–2035.
180. Schwab S, Spranger M, Schwarz S, Hacke W. Barbiturate coma in severe hemispheric stroke: useful or obsolete? *Neurology* 1997; 48:1608–1613.
181. Schwab S, Steiner T, Aschoff A, et al. Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. *Stroke* 1998; 29: 1888–1893.
182. Schwab S. Therapy of severe ischemic stroke: Breaking the conventional thinking. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20:169–178.

183. Schwarz S, Bertram M, Aschoff A, Schwab S, Hacke W. Indomethacin for brain edema following stroke. *Cerebrovasc Dis* 1999; 9:248–250.
184. Schwarz S, Georgiadis D, Aschoff A, et al. Effects of body position on intracranial pressure and cerebral perfusion in patients with large hemispheric stroke. *Stroke* 2002; 33:497–501.
185. Schwarz S, Georgiadis D, Aschoff A, et al.: Effects of hypertonic (10%) saline in patients with raised intracranial pressure after stroke. *Stroke* 2002; 33:136–140.
186. Shaw CM, Alvord EC, Berry GR. Swelling of the brain following ischemic infarction with arterial occlusion. *Arch Neurol* 1959; 1:161–177.
187. Shibuya M. Structure and function of VEGF/ VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26:25-35.
188. Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984; 60: 883-908.
189. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 1992; 77:169-184.
190. Sobesky J. Akutversorgung des ischämischen Schlaganfalls. *Internist* 2009; 50:1218–1226.
191. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Todesursachenstatistik 2006. (<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen.psm1>)
192. Steiner T, Ringleb P, Hacke W. Treatment options for large hemispheric stroke. *Neurology* 2001; 57:61–68.
193. Stiefel MF, Heuer GG, Smith MJ, Bloom S, Maloney-Wilensky E, Gracias VH, Grady MS, LeRoux PD. Cerebral oxygenation following decompressive hemicraniectomy for the treatment of refractory intracranial hypertension. *J Neurosurg* 2004; 101: 241–247.

194. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752–2758.
195. Stroke therapy academic industry roundtable II (STAIR-II): Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke* 2001; 32:1598-606.
196. Stroke Unit Trialists' Collaboration: Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD000197.
197. Terént A et al. Stroke Unit care revisited: who benefits the most? A cohort study of 105043 patients in Riks-Stroke, the Swedish Stroke Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 881-887.
198. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke. rt-PA Stroke Study Group Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333:1581-1587.
199. Treadwell S et al. Malignant middle cerebral artery (MCA) infarction: pathophysiology, diagnosis and management. *Postgrad Med J* 2010; 86:235-242.
200. Trenkler J. Der akute ischämische Schlaganfall-Bildgebende Diagnostik und interventionelle Möglichkeiten. *Radiologe* 2008; 48:457–473.
201. Toung TJ, Chang Y, Lin J, Bhardwaj A. Increases in lung and brain water following experimental stroke: effect of mannitol and hypertonic saline, *Crit Care Med* 2005; 33:203–208.
202. Toung TJ, Hurn PD, Traystman RJ, Bhardwaj A. Global brain water increases after experimental focal cerebral ischemia: effect of hypertonic saline. *Crit Care Med* 2002; 30:644–649
203. Uno M, Matsumoto K, Wallace MC. Neutral red staining for assessment of acute outcome in rat focal ischemia models. *Neurol Med Chir* 1995; 35:561-566.

204. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, et al. Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurology* 2007; 6:215–222.
205. Vahedi K, Vicaut E, Mateo J, et al. Sequential-design, multicenter, randomized, controlled trial of early decompressive craniectomy in malignant middle cerebral artery infarction (DECIMAL Trial). *Stroke*. 2007; 38:2506–2517.
206. Van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988; 19: 604–607.
207. Vogt P, Hopf B. Kühlung nach Reanimation- Eine retrospektive 5-Jahres-Analyse mit Langzeitergebnissen von 83 Patienten. *Intensivmed* 2011; 48:38–42.
208. Von Tell D et al. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006; 312: 623–629.
209. Wagner KR, Jauch EC. Extending the window for acute ischaemic stroke treatment: thrombolytics plus CNS protective therapies. *Exp Neurol* 2004; 188:195-199.
210. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Hacke W, Millan M, Muir K, et al. Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* 2008; 372:1303-1309.
211. Wahlgren N, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies—the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 2004; 17:153–166.
212. Walberer M. Das Makrosphärenmodell – Evaluation eines neuen Tiermodells zur Induktion fokaler zerebraler Ischämien an der Ratte. Promotionsschrift aus dem Fachbereich Veterinärmedizin 2005.
213. Walberer M, Blaes F, Stolz E, Muller C, Schoenburg M, Tschernatsch M, et al. Midline-shift corresponds to the amount of brain edema early after hemispheric stroke—an MRI study in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2007; 19:105–110.

214. Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, Volk K, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T. RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infection size in acute stroke. *Curr Neurovasc Res* 2009; 6:12–19.
215. Walberer M, Ritschel N, Nedelmann M, Volk K, Mueller C, Tschernatsch M, Stolz E, Blaes F, Bachmann G, Gerriets T. Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for Neuroprotection? *J Neurosurg* 2008; 109: 287–293.
216. Walberer M, Blaes F, Stolz E, Mueller C, Schoenburg M, Tschernatsch M, Bachmann G, Gerriets T. Midline-shift corresponds to the amount of brain edema early after hemispheric stroke--an MRI study in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2007; 19:105-110.
217. Weidner W, Hanafewmarkham CH. Intracranial collateral circulation via leptomeningeal and rete mirabile anastomoses. *Neurology* 1965; 15:39–48.
218. Weis SM, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437:497–504.
219. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. *Wie funktioniert MRI?*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2006:1-23.
220. Wiebers et al. Animal models of stroke: Are they relevant to human disease? *Stroke* 1990; 21:1-3.
221. Wirtz CR, Steiner T, Aschoff A, Schwab S, Schnippering H, Steiner HH, Hacke W, Kunze S. Hemicraniectomy with dural augmentation in medically uncontrollable hemispheric infarction. *Neurosurg Focus* 1997; 15:E3.
222. Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Ichihara S, Kato K, Kameyama T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Nozawa Y. Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1920-1925.

223. Yang Y, Li Q, Yang T, Hussain M, Shuaib A. Reduced brain infarct volume and improved neurological outcome by inhibition of the NR2B subunit of NMDA receptors by using CP101,606-27 alone and in combination with rt-PA in a thromboembolic stroke model in rats. *J Neurosurg* 2003; 98:397–403.
224. Yoshida K, Marmarou A. Effects of tromethamine and hyperventilation on brain injury in the cat. *J Neurosurg* 1991; 74:87–96.
225. Yurkewicz L, Weaver J, Bullock MR, Marshall LF. The effect of the selective NMDA receptor antagonist traxprodil in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005; 22:1428–1443.
226. Zhu HF, Newcommon NN, Cooper ME, Green TL, Seal B, Klein G, et al. Impact of a stroke unit on length of hospital stay and in hospital case fatality. *Stroke* 2009; 40:18-23.

VIII Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

IX Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere:

- Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps, der mir diese Promotionsarbeit seitens der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen ermöglicht hat.
- Herrn Prof. Dr. med. G. Bachmann für die Möglichkeit zur experimentellen Durchführung dieser Arbeit in der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim.
- Herrn Prof. Dr. med. T. Gerriets für die Überlassung des interessanten Promotions-themas sowie für seine fachlichen Ratschläge und die konsequente Unterstützung während der gesamten Entstehungsphase dieser Arbeit.
- Frau Dr. med. vet. M. Walberer möchte ich besonderen Dank aussprechen für die permanente Hilfe und die engagierte, konstruktive Unterstützung zu jeder Zeit.
- Herrn PD Dr. rer. nat. habil. M. Volk für die Korrektur meiner Arbeit.
- Meinen Eltern, Großeltern und meiner Frau für Ihr stete Anteilnahme und Motivation diese Arbeit zu vollenden.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

XI Anlage

1. Publikationsliste

Originalarbeiten

Walberer M, Ritschel N, Nedelmann M, **Volk K**, Mueller C, Tschernatsch M, Stolz E, Blaes F, Bachmann G, Gerriets T: Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for Neuroprotection? J Neurosurg 2008; 109: 287–293.

Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, **Volk K**, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T: RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarction size in acute stroke. Curr Neurovasc Res 2009; 6: 12–19.

2. Abstracts

Walberer W, Ritschel N, Nedelmann M, **Volk K**, Müller C, Tschernatsch M, Stolz E, Blaes F, Bachmann G, Gerriets T. Dekompression raumfordernder Hirninfarkte: Mehr als nur Herniationsprophylaxe? 25. Arbeitstagung für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin (ANIM), Wiesbaden, 31.01 – 02.02.2008 (abstract)

Gerriets T, Tschernatsch M, Nedelmann M, Walberer M, Ritschel N, Friedrich C, **Volk K**, Fischer S, Preissner KT, Bachmann G, Kaps M. Neuroprotektion durch Reduktion des Hirndrucks-Ein neuer Ansatz zur Akuttherapie des Hirninfarkts? 26. Arbeitstagung für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin (ANIM), Leipzig, 22. – 24.01.2009 (abstract)

Gerriets T, Tschernatsch M, Nedelmann M, Walberer M, Ritschel N, Friedrich C, **Volk K**, Fischer S, Preissner KT, Bachmann G, Kaps M. Neuroprotektion durch Reduktion des Hirndrucks bei akuten Hirninfarkten. 34. Jahrestagung der Sektion "Intrakranieller Druck, Hirnödeme und Hirndurchblutung" der DGNC, Mainz, 31.10 - 01.11. 2008 (abstract)

See the Editorial and Response in this issue, pp 285–286.

J Neurosurg 109:287–293, 2008

Aggravation of infarct formation by brain swelling in a large territorial stroke: a target for neuroprotection?

Laboratory investigation

MAUREEN WALBERER, D.V.M.,^{1,2} NOUHA RITSCHER, D.V.M.,^{1,2}
 MAX NEDELMANN, M.D.,^{1,2} KAI VOLK, B.S.,¹ CLEMENS MUELLER, PH.D.,³
 MARLENE TSCHERNATSCH, M.D.,² ERWIN STOLZ, M.D.,^{1,2} FRANZ BLAES, M.D.,²
 GEORG BACHMANN, M.D.,³ AND TIBO GERRIETS, M.D.^{1,2}

¹Experimental Neurology Research Group and ²Department of Neurology, Justus-Liebig-University Giessen; and ³Department of Radiology, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, Germany

Object. In territorial stroke vasogenic edema formation leads to elevated intracranial pressure (ICP) and can cause herniation and death. Brain swelling further impairs collateral blood flow to the ischemic penumbra and causes mechanical damage to adjacent brain structures. In the present study the authors sought to quantify the impact of this space-occupying effect on ischemic lesion formation.

Methods. Wistar rats were assigned to undergo bilateral craniectomy or a sham operation and then were subjected to temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 90 minutes. A clinical evaluation and 7-T MR imaging studies were performed 5 and 24 hours after MCAO. The absolute brain water content was determined at 24 hours by using the wet/dry method.

Results. Bilateral craniectomy before MCAO led to a drastic reduction in lesion volume at both imaging time points ($p < 0.0001$). Ischemic lesion volume was 2.7- and 2.3-fold larger in sham-operated animals after 5 and 24 hours, respectively. Clinical scores were likewise better in rats that had undergone craniectomy ($p < 0.05$). After 24 hours the midline shift differed significantly between the 2 groups ($p < 0.001$), but not after 5 hours. The relation between brain water content and ischemic lesion volume as well as the T2 relaxation time within the infarcted area was not different between the groups ($p > 0.05$).

Conclusions. The data indicated that collateral damage caused by the space-occupying effect of a large MCA territory stroke contributes seriously to ischemic lesion formation. The elimination of increased ICP thus must be regarded as a highly neuroprotective measure, rather than only a life-saving procedure to prevent cerebral herniation. Further clinical trials should reveal the neuroprotective potential of surgical and pharmacological ICP-lowering therapeutic approaches. (DOI: 10.3171/JNS.2008.109.8.0287)

KEY WORDS • brain edema • craniectomy • magnetic resonance imaging • neuroprotection • rat • stroke

ISCHEMIC stroke is accompanied by vasogenic brain edema formation that causes volume expansion of the affected tissue.^{1,23,35} In a large territorial stroke this space-occupying effect can raise ICP and cause lateral and vertical displacement of brain tissue, leading to midbrain compression, cerebral herniation, and death.^{2,10,13,15,20,30} The space-occupying effect of edema formation also impairs collateral blood flow to the ischemic penumbra and causes mechanical damage to adjacent brain structures and thus may contribute to ischemic lesion formation.^{5,7,9}

In the present study we sought to quantify the contribution of focal brain swelling to ischemic lesion formation. This information would be of interest in the development of therapeutic approaches targeting vasogenic

edema formation as a neuroprotective measure (“secondary neuroprotection”). We performed bilateral craniectomy in a stroke model in rats before MCAO to eliminate the space-occupying effect of vasogenic brain edema and then compared ischemic lesion formation with that in animals with intact skulls by using MR imaging.

Methods

Animal Preparation

All procedures were in accordance with German animal protection legislation. Twenty-four male Wistar rats (weighing 290–350 g) were anesthetized with isoflurane. Rectal temperature was maintained at 36.5–37.0°C during surgery and MR imaging.

Animals were randomly assigned to 2 treatment groups. In Group 1, 12 rats were treated with a bilateral craniectomy, whereas in Group 2, 12 rats were subjected to a sham procedure. In the craniectomy group the cau-

Abbreviations used in this paper: FOV = field of view; ICP = intracranial pressure; MCA = middle cerebral artery; MCAO = MCA occlusion; NEX = number of excitations; TA = acquisition time; T2RT = T2 relaxation time.

dal part of the os frontale and the complete os parietale, including the bone covering the sagittal sinus, were removed using a liquid-cooled trephine and microtweezers under microscopic control. The dura mater and sagittal sinus remained intact (Fig. 1). At the end of the procedure the wound was carefully covered with skin and sutured. The sham procedure was performed in the same way, although a bone lamella remained intact.

Occlusion of the right MCA was performed in all animals by using a silicone-coated nylon suture introduced through the common carotid artery, as described previously.¹⁸ The occluder was advanced into the internal carotid artery until the tip mechanically blocked blood flow to the MCA. Reperfusion was induced by removing the suture after 90 minutes.

Neurological evaluation was performed 5 and 24 hours after MCAO and scored on a 6-point scale as described previously.¹⁶ Magnetic resonance imaging was performed at 2 time points (5 and 24 hours after MCAO), as described below.

After the 24-hr MR imaging study, the animals were deeply anesthetized and killed. All brains were inspected as they were removed from the skull to detect subarachnoid hemorrhage. Afterward they were assigned to wet/dry analysis.

In 6 additional animals the influence of bilateral craniectomy on cortical temperature was evaluated. These animals were also randomized to 2 treatment groups, either bilateral craniectomy or sham procedure. A temperature probe was placed with the aid of stereotaxy through the skin (or through a small bur hole in rats in the sham-operated group) into the parietal cortex of the right hemisphere. The bur hole was also closed with dental cement. Cortical and rectal temperatures were monitored for 2 hours.

The effects of unilateral craniectomy were assessed in 3 additional animals by using MR imaging.

Magnetic Resonance Imaging

The MR imaging unit (7.0 T, 16-cm magnet, Bruker PharmaScan) was operated at 300.51 MHz for proton imaging and equipped with a 300-mT/m self-shielding gradient system. Localizer images were acquired using a spin echo sequence. Rapid acquisition with relaxation enhancement sequences (20 contiguous 1-mm-thick slices, TR 2500 msec, TE 41.8 msec) were used to verify symmetric positioning.¹⁷

Diffusion Weighted Imaging. To map the apparent diffusion coefficient of water, diffusion weighted images were acquired with the use of a fat-suppressing echo planar sequence. A volume shim with a volume-selective double spin echo sequence (TR 1 second, TE 30 msec, voxel size $10 \times 8 \times 15 \text{ mm}^3$) was performed before acquisition of the first diffusion series to optimize imaging quality. The full width at half maximum of the water line was $\sim 25\text{--}35 \text{ Hz}$.

Six contiguous coronal slices with a thickness of 2 mm were collected (FOV $32 \times 32 \text{ mm}$, matrix 128×128 , TR 3003 msec, TE 38.6 msec, NEX 4). Fourfold segmentation was used to reduce imaging artifacts due to local field inhomogeneity. Five sets of coronal images were re-

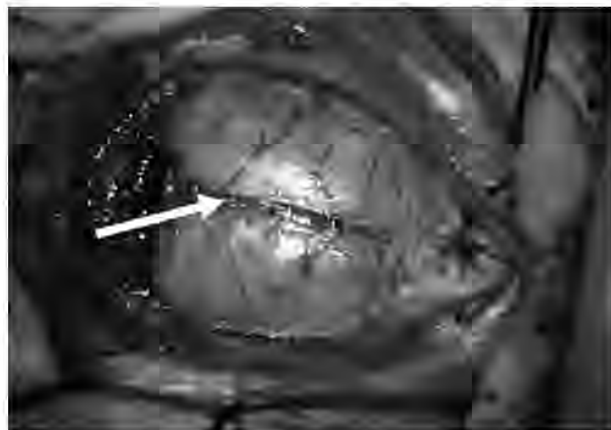


FIG. 1. Photograph demonstrating an unharmed dura mater after bilateral craniectomy. Arrow indicates the sagittal sinus.

corded for apparent diffusion coefficient quantification, with an equidistant diffusion gradient duration (δ) of 9 msec and a gradient separation time (Δ) of 15 msec, resulting in the 5 following b values (s/mm^2): 6.96, 111.3, 340.8, 695.6, and 1175.5. The TA for each echo planar sequence was 4.5 minutes.

T2-Weighted Imaging. A Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin echo imaging sequence was used to map lesion and hemisphere volumes. Eight contiguous coronal slices with a thickness of 2 mm (gap 0 mm) were acquired (FOV $37 \times 37 \text{ mm}$, matrix 512×256 , TR 3833.5 msec, 12 echoes: TE 18–216 msec (ΔTE 18 msec), TA 16.25 minutes, NEX 1).

T2*-Weighted Imaging. Fast imaging with steady-state procession T2*-weighted imaging sequences were used to detect extra- or intracerebral hemorrhage. Sixteen contiguous 1-mm-thick coronal slices (gap 0 mm) were acquired (FOV $37 \times 37 \text{ mm}$, matrix 256×256 , TR 43.4 msec, TE 7.0 msec, TA 12 minutes 7 seconds, NEX 4).

Data Evaluation. Lesion volume was calculated as described elsewhere.¹⁷ Briefly, computer-aided planimetric assessment of the lesion and hemisphere volume was performed using image analysis software (ImageJ, version 1.25s, National Institutes of Health). After adjusting the contrast, the contours of the hemispheres were traced manually on each slice. The position of the midline was determined using neuroanatomical landmarks. Lesion volumes were determined with computer-aided manual tracing of the hyperintense lesions on each slice. Volumes of the ipsilateral and contralateral hemispheres (HV_i and HV_c , respectively) and the lesion (LV) were calculated by summing up the volumes from all slices. Lesion volumes ($\%HLV^a$) were calculated using the following equation: $\%HLV^a = (2 \times LV/HV_c + HV_i) \times 100$.

The T2RT. The T2RT was measured in regions of interest within the center of the ischemic area on all slices displaying ischemic lesions and a corresponding position on the contralateral hemisphere. The difference in T2RTs between the ischemic and unaffected hemispheres was calculated.

Aggravation of infarct formation by brain swelling

Midline-Shift Quantification. Midline-shift quantification was performed on T2-weighted MR images, in which the position of the third ventricle could be clearly determined in all animals. The distance between the outer border of the cortex and the center of the third ventricle was measured from the ipsilateral and contralateral sides, as described previously.⁹ Measurements were obtained at the level of maximum lateral displacement of the ventricle. The midline shift was calculated using the following equation, where *MLS* is the midline shift and *A* and *B* are the ipsilateral and contralateral sides, respectively:^{14,15,28} $MLS = (A - B)/2$.

Postmortem Analysis

To analyze the absolute brain water content (%H₂O), the brain convexities were separated into ipsilateral and contralateral hemispheres. The wet weight of both hemispheres was measured. The tissue was then dried to a constant weight and weighed again. Brain water content was calculated using the following equation:¹⁷ %H₂O = (wet weight – dry weight)/wet weight × 100.

The absolute increase in brain water content of the ischemic hemisphere (%ΔH₂O) was expressed as the difference in %H₂O between the 2 hemispheres. Since the increase in brain water content depends on ischemic lesion volume, an edema/ischemic lesion volume ratio was calculated by dividing %ΔH₂O by the lesion volume determined on MR imaging.

Statistical Analysis

Clinical evaluation and wet/dry measurements were performed by experienced investigators who were blinded to group assignment.

Data are presented as the means ± standard deviation. Parametric and nonparametric data were compared using the Student t-test or Mann–Whitney U-test. A probability level < 0.05 was considered statistically significant.

Results

One animal in each group died before the 24-hour imaging study. Another animal displayed no clinical deficit and no infarct on MR imaging. These rats were excluded from the study and replaced.

All animals subjected to unilateral craniectomy revealed substantial brain herniation as documented on MR imaging (see Fig. 4).

In animals subjected to bilateral craniectomy and sham operation, body weight, body temperature, and other baseline parameters did not differ between the groups (*p* > 0.05, data not shown). No hemorrhagic complications were detectable on T2*-weighted MR imaging or on autopsy.

In animals subjected to bilateral craniectomy prior to MCAO, the mean ischemic lesion volume was 12.8 ± 11.3% after 5 hours and 25.4 ± 12.6% after 24 hours, whereas sham-operated animals displayed drastically larger lesions (34.0 ± 10.8% after 5 hours and 57.9 ± 13.0% after 24 hours). This difference was statistically significant at both time points (12 rats per group; *p* < 0.0001).

Clinical scores at 5 and 24 hours after MCAO were significantly better in the animals that had undergone bilateral craniectomy (1.67 ± 0.49) compared with those in the sham-operated rats (2.0 ± 0.0; *p* < 0.05). The cortical temperature in relation to rectal temperature was not significantly different between the 2 treatment groups (*p* > 0.05; Fig. 2). After 24 hours the midline shift differed significantly between the 2 groups (*p* < 0.001), but not after 5 hours (*p* > 0.05; Fig. 3).

The absolute brain water content, as determined using the wet/dry method, was significantly reduced 24 hours after MCAO in the animals treated with craniectomy (1.03 ± 2.07 compared with 3.28 ± 1.31 in sham-operated rats; *p* < 0.05). However, the relation between brain water content and ischemic lesion volume as well as the T2RT quantification in regions of interest was not different between the groups, indicating that edema formation within the ischemic lesion was not affected by the surgical intervention.

Discussion

Decompressive craniectomy results in a decrease in ICP and brain shift in patients with a large MCA territory stroke and thus prevents cerebral herniation and death.^{4,24,25} Data from a recently published pooled analysis of 3 randomized trials have indicated that early hemi-craniectomy decreases the mortality rate from 78 to 29% in patients with a malignant MCA infarction;³⁴ therefore, decompressive craniectomy increasingly has been proposed as a life-saving measure in patients severely affected with stroke.^{3,19,22,24–27,29–31,33,34,36}

Data from experimental studies, however, suggest that decompressive craniectomy not only prevents cerebral herniation but also provides robust neuroprotective effects.^{5–9,11,21} Engelhorn and coworkers⁷ performed unilateral decompressive craniectomy or reperfusion in a rat stroke model 1 hour after the onset of ischemia. They found that ischemic lesion volume was distinctively reduced in animals that had undergone craniectomy (130 ± 36 mm³) compared with controls (284 ± 37 mm³); only early reperfusion resulted in an even more pronounced neuroprotective effect (62 ± 25 mm³). The same group¹¹ investigated the efficiency of decompressive craniectomy or reperfusion therapy at different delayed time points. The results indicated that reperfusion later than 1 hour after MCAO was no longer beneficial in the rat stroke model used, whereas decompressive craniectomy led to a significant reduction in ischemic lesion volume 4 and even 12 hours after MCAO. These findings are explained by a profound improvement in regional cerebral blood flow, particularly within the cortex, that was comparable to the improvement achieved using reperfusion.^{5,7,9} One can assume that the space-occupying effect caused by vasogenic edema formation within the ischemic tissue causes regional compression of pial and other vessels providing collateral blood flow to the penumbra. Decompressive craniectomy reduces the space-occupying effect and thus improves collateral blood flow.^{7,9,11,32} Furthermore, craniectomy might attenuate the edema-related displacement of brain structures and thus result in a reduction in mechanical damage to adjacent tissue.

M. Walberer et al.

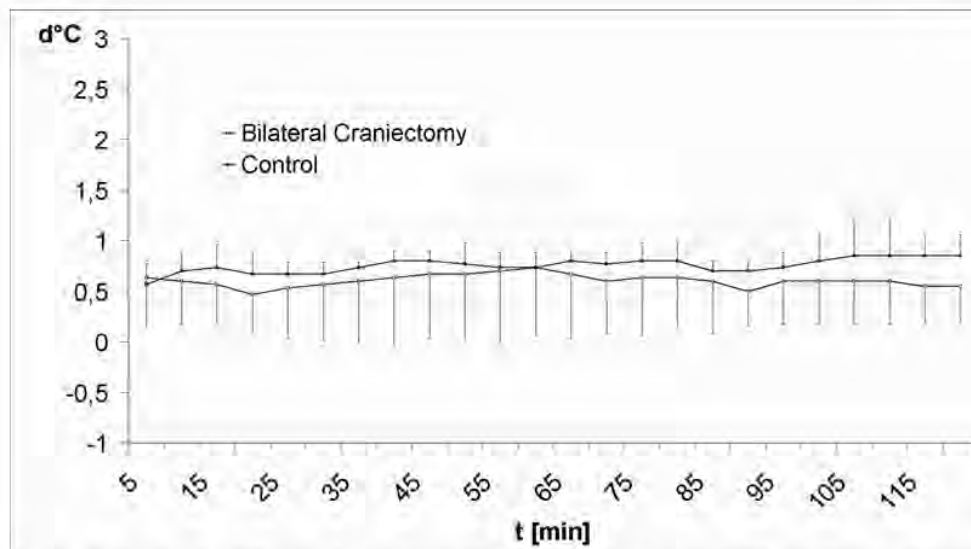


FIG. 2. Graph showing the difference between cortical and rectal temperatures (d°C) over time (t). No significant differences in temperature could be shown between animals subjected to bilateral craniectomy and those that underwent a sham procedure. The temperature in rats treated with craniectomy was 0.15°C colder on average.

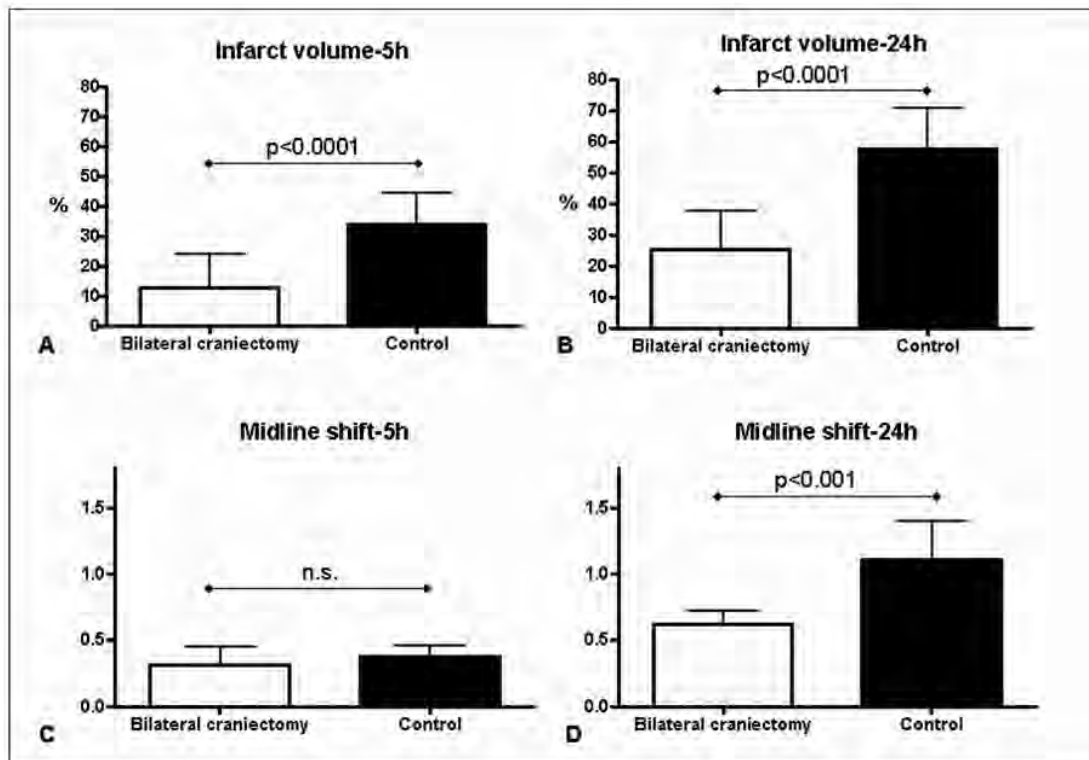


FIG. 3. A and B: Graphs revealing the mean ischemic lesion volume, as determined using MR images, expressed as a percentage of the hemisphere volume. Bilateral craniectomy before MCAO led to a significantly smaller ischemic lesion volume after 5 and 24 hours. C and D: Graph depicting the difference in the mean midline shift between animals that underwent craniectomy and those that underwent sham operation after 24 hours but not after 5 hours. n.s. = not significant.

Aggravation of infarct formation by brain swelling

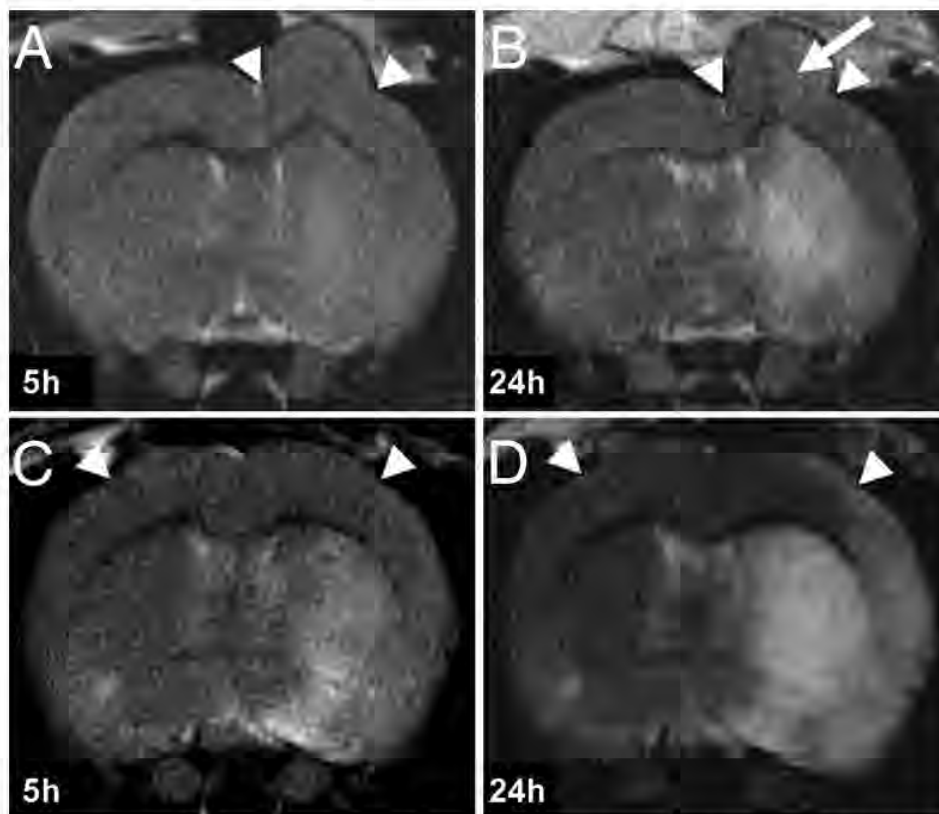


FIG. 4. A and B: Magnetic resonance images showing the results of unilateral craniectomy with incision of the dura mater (this incision was not part of the present study). Note the cerebral herniation through the incision causing incarceration of brain tissue with subsequent ischemia after 24 hours (arrow). Arrowheads indicate the margins of the bone incision. C and D: Magnetic resonance images revealing the results of bilateral craniectomy without incision of the dura mater. Arrowheads indicate the cutting edge of the skull. Note the slight protrusion of the brain between the arrowheads.

The importance of the space-occupying effect of edema formation for the development of an ischemic lesion appears to be largely underestimated. Thus the present study was designed to determine the contribution of brain swelling to ischemic lesion formation in a large MCA territory stroke. For this purpose we aimed to eliminate the space-occupying effect by performing a bilateral decompressive craniectomy. This innovative method allows a pronounced reduction in ICP without opening the dura mater. The advantage of this surgical technique lay in the prevention of cerebral incarceration through the dural aperture, a typical complication of unilateral craniectomy tending toward additional brain damage (Fig. 4). Furthermore a loss of cerebrospinal fluid and the risk of infectious and hemorrhagic complications are reduced.

In contrast to methods applied in all previous related studies, we performed craniectomy prior to MCAO and with the aid of MR imaging compared lesion and edema formation with that in animals whose skulls remained intact. This approach allowed us to eliminate the effect of brain compression on ischemic lesion formation from the outset. Comparing animals with and without brain compression enabled us to determine to what extent brain swelling might aggravate infarct formation.

Our results 24 hours after MCAO indicated that lesion volume is 2.3 times larger in animals that have not undergone craniectomy. This finding suggests that more than half of the infarct volume is attributable to collateral damage caused by the space-occupying effect of vasogenic edema formation. This surprisingly clear effect might even be underestimated in the present study given that the technique of bilateral craniectomy leads only to a reduction in and not a virtual elimination of the space-occupying effect, as documented by the small but notable midline shift after 24 hours.

The present findings, however, apply only to large ischemic lesions. Smaller territorial or even lacunar infarcts might not benefit from decompression because they do not develop enough edema to impair collateral blood flow to a noticeable extent.¹⁰

Other potential neuroprotective effects caused by decompressive craniectomy need to be discussed in this context. The removal of large parts of the skull might lead to focal cooling of the cortex. Focal hypothermia provides strong neuroprotective effects and thus might reduce infarct volume.¹² We aimed to avoid this effect by applying a careful surgical technique that essentially preserved physiological blood circulation of the skin flaps,

which were then accurately replaced over the dura mater by using a thorough suture technique. Monitoring of cortical and rectal temperatures in a subset of animals treated with craniectomy or sham operation indicated that our technique does not lead to local cooling of the brain (Fig. 2). Thus focal hypothermia cannot explain the drastically different lesion volumes between the groups.

Conclusions

In summary the present data indicate that collateral damage caused by the space-occupying effect of a large MCA territory stroke contributes seriously to ischemic lesion formation. The elimination of increased ICP thus must be regarded as a highly neuroprotective measure, rather than only a life-saving procedure to prevent cerebral herniation. Further clinical trials are required to determine the neuroprotective potential of ICP-lowering therapeutic approaches, such as decompressive craniectomy, or blood-brain barrier-stabilizing measures that reduce vasogenic edema formation.

References

1. Ayata C, Ropper AH: Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* **9**:113–124, 2002
2. Berrouschot J, Sterker M, Bettin S, Köster J, Schneider D: Mortality of space occupying ("malignant") middle cerebral artery infarction under conservative intensive care. *Intensive Care Med* **24**:620–623, 1998
3. Carter BS, Ogilvy CS, Candia GJ, Rosas HD, Buonanno F: One-year outcome after decompressive surgery for massive nondominant hemispheric infarction. *Neurosurgery* **40**:1168–1176, 1997
4. Cho DY, Chen TC, Lee HC: Ultra-early decompressive craniectomy for malignant middle cerebral artery infarction. *Surg Neurol* **60**:227–232, 2003
5. Doerfler A, Engelhorn T, Heiland S, Benner T, Forsting M: Perfusion- and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for monitoring decompressive craniectomy in animal with experimental hemispheric stroke. *J Neurosurg* **96**:933–940, 2002
6. Doerfler A, Schwab S, Hoffmann TT, Engelhorn T, Forsting M: Combination of decompressive craniectomy and mild hyperthermia ameliorates infarction volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke* **32**:2675–2681, 2001
7. Engelhorn T, Doerfler A, de Crespigny A, Beaulieu C, Forsting M, Moseley ME: Multilocal magnetic resonance perfusion mapping comparing the cerebral hemodynamic effects of decompressive craniectomy versus reperfusion in experimental acute hemispheric stroke in rats. *Neurosci Lett* **344**:127–131, 2003
8. Engelhorn T, Dörfler A, Egelhof T, Schwab S, Heiland S, Sartor K, et al: [Follow-up monitoring with magnetic resonance tomography after decompressive trephining in experimental "malignant" hemispheric infarct.] *Zentralbl Neurochir* **59**:157–165, 1998 (Ger)
9. Engelhorn T, Doerfler A, Kastrup A, Beaulieu C, de Crespigny A, Forsting M, et al: Decompressive craniectomy, reperfusion, or a combination for early treatment of acute "malignant" cerebral hemispheric stroke in rats? *Stroke* **30**:1456–1463, 1999
10. Engelhorn T, Heiland S, Schabitz WR, Schwab S, Busch E, Forsting M, et al: Decompressive craniectomy in acute cerebral ischemia in rats. Is there any benefit in smaller thromboembolic infarcts? *Neurosci Lett* **370**:85–90, 2004
11. Engelhorn T, von Kummer R, Reith W, Forsting M, Doerfler A: What is effective in malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* **33**:617–622, 2002
12. Fisher M, Gerriets T: Cerebral neuroprotection, in Latchaw RE, Kucharczyk J, Moseley ME (eds): **Imaging of the Nervous System: Diagnostic and Therapeutic Applications**. Philadelphia: Mosby Inc, 2005, Vol 1, pp 453–462
13. Frank JI: Large hemispheric infarction, deterioration, and intracranial pressure. *Neurology* **45**:1286–1290, 1995
14. Gerriets T, Stolz E, König S, Babacan S, Fiss I, Jauss M, et al: Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: an early outcome predictor. *Stroke* **32**:442–447, 2001
15. Gerriets T, Stolz E, Modrau B, Fiss I, Seidel G, Kaps M: Sonographic monitoring of midline shift in hemispheric infarctions. *Neurology* **52**:45–49, 1999
16. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M: Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke* **34**:2234–2239, 2003
17. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Kluge A, Kaps M, et al: Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* **12**:137–143, 2004
18. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C, Kluge A, et al: Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* **35**:2372–2377, 2004
19. Gupta R, Connolly ES, Mayer S, Elkind MS: Hemispheric craniectomy for massive middle cerebral artery territory infarction: a systemic review. *Stroke* **35**:539–543, 2004
20. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R: "Malignant" middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol* **53**:309–315, 1996
21. Hofmeijer J, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Kappelle LJ, Bar PR: Delayed decompressive surgery increases apparent diffusion coefficient and improves peri-infarct perfusion in rats with space-occupying cerebral infarction. *Stroke* **35**:1476–1481, 2004
22. Holtkamp M, Buchheim K, Unterberg A, Hoffmann O, Schielke E, Weber JR, et al: Hemispheric craniectomy in elderly patients with space occupying media infarction: improved survival but poor functional outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**:226–228, 2001
23. Hossman KA: Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* **26**:1057–1083, 2006
24. Hutchinson P, Timofeev I, Kirkpatrick P: Surgery for brain edema. *Neurosurg Focus* **22**(5):E14, 2007
25. Lanzino DJ, Lanzino G: Decompressive craniectomy for space-occupying supratentorial infarction: rationale, indications, and outcome. *Neurosurg Focus* **8**(5):E3, 2000
26. Leonhardt G, Wilhelm H, Doerfler A, Ehrenfeld CE, Schoch B, Rauhut F, et al: Clinical outcome and neuropsychological deficits after right decompressive hemispheric craniectomy in MCA infarction. *J Neurol* **249**:1433–1440, 2002
27. Pranesh MB, Dinesh Nayak S, Mathew V, Prakash B, Natarajan M, Rajmohan V, et al: Hemispheric craniectomy for large middle cerebral artery territory infarction: outcome in 19 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**:800–802, 2003
28. Pullicino PM, Alexandrov AV, Shelton JA, Alexandrova NA, Smurawska LT, Nowis JW: Mass effect and death from severe acute stroke. *Neurology* **49**:1090–1095, 1997
29. Rieke K, Schwab S, Krieger D, von Kummer R, Aschoff A, Schuchardt V, et al: Decompressive surgery in space-occu-

Aggravation of infarct formation by brain swelling

- pying hemispheric infarction: results of an open, prospective trial. **Crit Care Med** **23**:1576–1587, 1995
30. Sakai K, Iwahashi K, Terada K, Gohda Y, Sakurai M, Matsumoto Y: Outcome after external decompression for massive cerebral infarction. **Neurol Med Chir (Tokyo)** **38**:131–135, 1998
 31. Schwab S, Steiner T, Aschoff A, Schwarz S, Steiner HH, Jansen O, et al: Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. **Stroke** **29**:1888–1893, 1998
 32. Stiefel MF, Heuer GG, Smith MJ, Bloom S, Maloney-Wilensky E, Gracias VH, et al: Cerebral oxygenation following decompressive hemicraniectomy for the treatment of refractory intracranial hypertension. **J Neurosurg** **101**:241–247, 2004
 33. Uhl E, Kreth FW, Elias B, Goldammer A, Hempelmann RG, Liefner M, et al: Outcome and prognostic factors of hemicraniectomy for space occupying cerebral infarction. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **75**:270–274, 2004
 34. Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, et al: Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. **Lancet Neurol** **6**:215–222, 2007
 35. Walberer M, Blaes F, Stolz E, Muller C, Schoenburg M, Tschernatsch M, et al: Midline-shift corresponds to the amount of brain edema early after hemispheric stroke—an MRI study in rats. **J Neurosurg Anesthesiol** **19**:105–110, 2007
 36. Walz B, Zimmermann C, Bottger S, Haberl RL: Prognosis of patients after hemicraniectomy in malignant middle cerebral artery infarction. **J Neurol** **249**:1183–1190, 2002

Manuscript submitted September 14, 2007.

Accepted December 3, 2007.

Sources of support: This study was generously supported by the Willy und Monika Pitzer Foundation, Bad Nauheim, Germany, and the Kerckhoff Clinic, Bad Nauheim, Germany.

Address correspondence to: P.D. Dr. med. Tibo Gerriets, Universitätsklinikum Giessen, Klinik für Neurologie, Am Steg 20, 35390 Giessen, Germany. email: Tibo.Gerriets@neuro.med.uni-giessen.de.

RNase Therapy Assessed by Magnetic Resonance Imaging Reduces Cerebral Edema and Infarction Size in Acute Stroke

Maureen Walberer^{1,†}, Marlene Tschernatsch^{2,†}, Silvia Fischer³, Nouha Ritschel^{2,4}, Kai Volk⁴, Carolin Friedrich⁴, Georg Bachmann⁴, Clemens Mueller⁴, Manfred Kaps², Max Nedelmann^{2,4}, Franz Blaes², Klaus T. Preissner³ and Tibo Gerriets^{*,2,4}

¹Department of Neurology, University Hospital Cologne, Germany

²Department of Neurology, Justus Liebig-University Giessen, Germany

³Department of Biochemistry Medical School, Justus-Liebig-University, Giessen

⁴Experimental Neurology Research Group, Justus Liebig-University Giessen, Germany and Kerckhoff-Clinic Bad Nauheim, Germany

Abstract: Ischemic stroke causes cell necrosis with the exposure of extracellular ribonucleic acid (RNA) and other intracellular material. As shown recently, extracellular RNA impaired the blood-brain-barrier and contributed to vasogenic edema-formation. Application of ribonuclease 1 (RNase 1) diminished edema-formation and also reduced lesion volume in experimental stroke. Here we investigate whether reduction of lesion volume is due to the reduction of edema or of other neuroprotective means.

Neuroprotective and edema protective effects of RNase 1 pretreatment were assessed using a temporary middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in rats. Lesion volume was assessed on magnetic resonance imaging (MRI), T2-relaxation-time and midline-shift as well as brain water content (wet-dry-method) were measured to quantify edema formation. The impact of edema formation on infarct volume was evaluated in craniectomized animals.

Exogenous RNase 1 was well tolerated and reduced edema-formation and infarct size (26.7% ± 10.7% vs. 41.0% ± 10.3%; p<0.01) at an optimal dose of 42 µg/kg as compared to placebo. Craniectomized animals displayed a comparable edema reduction but no reduction in infarct size.

The present study introduces a hitherto unrecognized mechanism of ischemic brain damage and a novel neuroprotective approach towards acute stroke treatment.

Keywords: Acute stroke, edema, RNase, neuroprotection, craniectomy.

INTRODUCTION

Stroke is the third-most leading cause of death and the leading cause of adult disability in the industrialized world. Neuroprotective drugs can reduce ischemic damage when applied early after stroke onset and thus could be an effective treatment option alone or in combination with acute revascularization maneuvers (Savitz *et al.*, 2007; Faden *et al.*, 2007).

Ischemic stroke causes cell necrosis and leads to exposure of intracellular material. As shown recently, extracellular ribonucleic acid (RNA) increased the permeability of the blood brain barrier *in vitro* and *in vivo* and thus contributed to vasogenic edema formation. This fundamentally new mechanism of ischemic brain damage is mediated through vascular endothelial growth factor (VEGF) (Fischer *et al.*, 2007). Application of ribonuclease 1

(pancreatic RNase) inhibited these deleterious RNA-mediated effects *in vitro* as well as in animal models of acute ischemic stroke and sinus thrombosis, resulting in a marked reduction of vasogenic edema formation. Furthermore RNase 1-treatment reduced ischemic lesion size in experimental cerebral ischemia (Fischer *et al.*, 2007).

Pancreatic ribonuclease is known to be part of the RNase A superfamily (Beintema, 1998), which members are all secreted enzymes with pleiotropic biological activities. Previously, it has been reported that human endothelial cells express large amounts of pancreatic-type RNase 1 and angiogenin (Landre *et al.*, 2002). Pancreatic-type RNase and angiogenin are major RNases in the blood circulation, with median serum concentrations of ~400 ng/ml and ~250 ng/ml (Weickmann *et al.*, 1984), (Bläser *et al.*, 1993). Whereas pancreatic-type RNase 1 exhibits significant activity against double-stranded RNA, angiogenin has high angiogenic effects. Inside the cells RNase 1 is inactivated by strong binding to the RNase inhibitor and thus, has no cytotoxic effects (Gaur *et al.*, 2001). Endothelial expression of RNase 1 suggests that this enzyme might be the natural counterpart of RNA, released from damaged cells under pathological conditions, in the vascular system.

*Address correspondence to this author at Universitaetsklinikum Giessen, Klinik für Neurologie, Am Steg 14, D-35390 Giessen, Germany; Tel: +49-641-9945445; Fax: +49-641-9945448; E-mail: tibo.gerriets@neuro.med.uni-giessen.de

[†]Both authors contributed equally to this work.

Received: November 04, 08; Revised: December 10, 08; Accepted: December 17, 08

The present study aims to analyze the underlying neuroprotective mechanism and particularly the interrelationship between edema-formation and neuroprotection of RNase-1 treatment in acute stroke.

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation

All procedures are in accordance with the German animal protection legislation. Male Wistar rats (270-340 g; n=136) were anesthetized with isoflurane. Rectal temperature was maintained at 36.5-37.0°C during surgery and MR-imaging.

Focal cerebral ischemia was induced as described previously (Gerriets *et al.*, 2004). Briefly, a silicone-coated nylon suture was introduced through the common carotid artery. The occluder was advanced into the internal carotid artery until its tip blocked blood flow to the middle cerebral artery (MCA) mechanically. Reperfusion was induced by withdrawing the suture after 90 min.

Tolerability of RNase1

Five healthy animals were treated with 1125 µg/kg RNase 1 intravenously. Arterial blood pressure was measured continuously for 5min before and for 30 min after application. Blood gas analysis (pH, pO₂, pCO₂, base excess) and blood glucose levels were measured 5 and 30 min after treatment and compared to baseline.

Dose-Effect Relationship

One hundred and two animals were randomly assigned to seven treatment groups. The drug (1 ml saline alone or containing either 13 µg/kg, 42 µg/kg, 125 µg/kg, 375 µg/kg, 1125 µg/kg or 3750 µg/kg RNase 1; see Table 1) was injected intravenously 10 min before middle cerebral artery occlusion (MCAO). The dosages were selected based on a pilot study with 125 µg/kg RNase 1 (not shown). This dose was multiplied / divided by 3. Reperfusion was achieved after 90 min. Neurological evaluation was performed 70 min, 5 h and 24 h after MCAO and scored on a 7-point scale as described previously (Gerriets *et al.*, 2004; Gerriets *et al.*, 2004). Animals were subjected to magnetic resonance imaging (MRI) at 5 h and 24 h after MCAO. After completion of the MRI-protocol, the animals were deeply anaesthetized and euthanized. All brains were inspected on subarachnoid hemorrhage then subjected to wet-dry-analysis as described below.

Table1. Treatment Groups

Group	Treatment
1	Placebo
2	13µg/kg RNase 1
3	42µg/kg RNase 1
4	125µg/kg RNase 1
5	375µg/kg RNase 1
6	1125µg/kg RNase 1
7	3375µg/kg RNase 1

Neuroprotective Properties of RNase 1

Twenty-nine animals were subjected to bilateral craniectomy as described previously (Walberer *et al.*, 2008). Briefly, the entire Os parietale and the caudal part of the Os frontale were removed, using a liquid cooled trephine. The dura mater was left intact.

Then, the animals were randomly assigned to two treatment groups, receiving either 1ml saline alone or containing 42 µg/kg RNase 1 intravenously. Ten min later the rats were subjected to MCAO for 90 min followed by reperfusion.

Neurological evaluation was performed after 5 h and 24 h as described above. A Rotarod-test was performed at baseline and 24 h after MCAO and the difference in Rotarod-performance was calculated (Hamm *et al.*, 1994).

MRI investigation was carried out 5 h and 24 h after MCAO, followed by wet-dry-analysis as described above.

Magnetic Resonance Imaging

The MRI tomograph (Bruker PharmaScan 7.0T, 16 cm; Ettlingen, Germany) is operating at 300.51 MHz for ¹H-imaging and is equipped with a 300 mT/m self-shielding gradient system. Localizer images were acquired using a spin-echo sequence. RARE sequences (20 contiguous slices, 1 mm thickness, TR=2500 ms, TE=41.8 ms) were used to verify symmetric positioning (Gerriets *et al.*, 2004).

Diffusion weighted imaging (DWI): To map the apparent diffusion coefficient of water (ADC), DWI was acquired with the use of a fat suppressing echo-planar imaging (EPI)-sequence. A volume shim with a volume selective double spin echo sequence (TR=1 s, TE=30 ms, voxel-size 10x8x15 mm³) was performed before the acquisition of the first diffusion series to optimize imaging quality. The achieved full-width at half-maximum (FWHM) of water line was about 25-35 Hz. Six contiguous, coronal slices with a thickness of 2mm were collected with a field of view of 32x32 mm and a matrix size of 128x128 (TR=3003 ms, TE=38.6 ms, NEX=4). A four-fold segmentation was used to reduce imaging artifacts due to local field inhomogeneity. Five sets of coronal images were recorded for ADC quantification, with equidistant diffusion gradient duration (δ) of 9 ms and a gradient separation time (Δ) of 15 ms, this resulted in five b-values (6.96, 111.3, 340.8, 695.6 and 1175.5 s/mm²). The acquisition time for each EPI sequence was 4.5 min.

T2-Imaging: A Carr Purcell Meiboom Gill spin-echo imaging sequence was used to map lesion- and hemispheric volumes. Eight contiguous, coronal slices (thickness: 2mm, gap: 0mm) were acquired with a field of view of 37x37 mm and a matrix size of 512x256 (TR=3833.5 ms, NEX=1, 12 echoes: TE=18 ms to 216 ms (ΔTE=18 ms), TA=16.25 min).

T2*-Imaging: A SNAP-T2*-imaging sequence was used to exclude hemorrhages. Sixteen contiguous, coronal slices (thickness 1mm, gap: 0mm) were acquired with a field of view of 37 x 37 mm and a matrix size of 256x256 (TR=43.4 ms, TE=7.0 ms, TA=12 min 7 sec).

Ischemic lesion volume was assessed planimetrically. Lesion volume was corrected for the space occupying effect

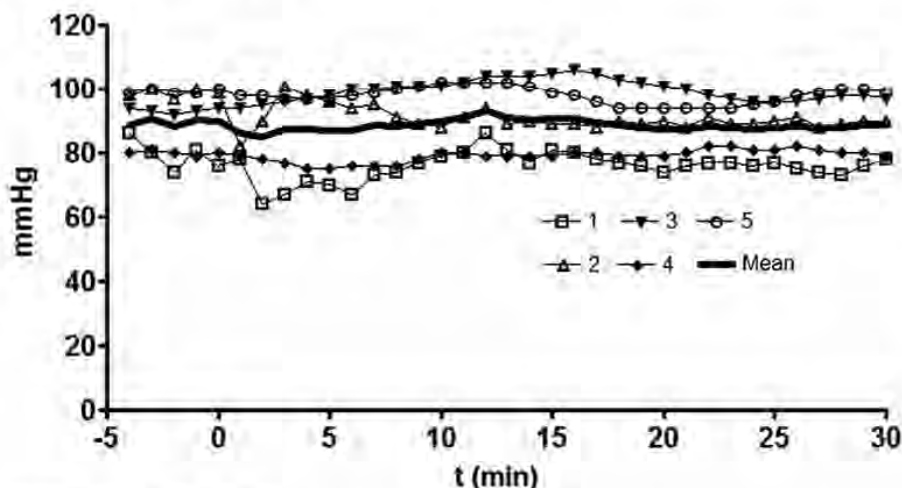


Fig. (1). Influence of RNase 1 on blood pressure.

Intravenous application of RNase 1 (1125 µg/kg) was carried out in five rats and blood pressure was measured over the indicated time period (bold line indicates mean value).

of brain edema using the following equation (Gerriets *et al.*, 2004):

$$\%HLV^e = \frac{HV_c - HV_i + LV}{HV_c} \cdot 100$$

In experiment 3 an equation for uncorrected lesion volume was used, since the above mentioned calculation method requires an intact skull (Gerriets *et al.*, 2004):

$$\%HLV^u = \frac{2 \cdot LV}{HV_c + HV_i} \cdot 100$$

(%HLV^e and %HLV^u: Edema corrected and uncorrected lesion volume (in percent of the hemisphere); HV_c and HV_i: Contralateral and ipsilateral hemispheric volume; LV: Lesion volume)

T2-relaxation time (T2RT) was quantified in regions of interest (ROI) within the center of the ischemic area on one slice displaying the largest ischemic lesion and at the corresponding position of the contralateral hemisphere and side-to-side differences were calculated.

Midline shift (MLS) quantification was performed on T2-weighted images after 24 h. The position of the third ventricle could be determined clearly in all animals. The distance between the outer border of the cortex and the middle of the third ventricle was measured from the ipsilateral and contralateral side as described previously

(Walberer *et al.*, 2007). Measurements were performed at the level of maximum lateral displacement. MLS was calculated using the following equation (Gerriets *et al.*, 2001; Gerriets *et al.*, 1999; Pullicino *et al.*, 1997):

$$MLS = \frac{A - B}{2}$$

Quantification of Brain Water Content (%H₂O) with the Wet-Dry-Technique

The convexities of the brains were separated and wet weight of both hemispheres was measured. The tissue was then dried to a constant weight and weighed again. %H₂O was calculated using following equation (Gerriets *et al.*, 2004):

$$\%H_2O = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{wet weight}} \cdot 100$$

The increase of brain water content of the ischemic hemisphere (%ΔH₂O) was expressed as the difference in %H₂O between both hemispheres.

Statistics

Clinical evaluation, MRI- and wet-dry-measurements were performed by experienced investigators who were blinded for group assignment.

Table 2. Physiological Parameters

	pO ₂ (mmHg)		pCO ₂ (mmHg)		pH		Hb (mmol/l)		Blood Glucose (mg/dl)	
	baseline	30min	baseline	30min	baseline	30min	baseline	30min	baseline	30min
mean	84,12	81,4	36,48	38,52	7,381	7,373	11,58	11,2	147	150
SD	3,73	2,41	2,22	1,77	0,005	0,022	0,6	0,2	11	14

RNase 1-treatment, even at high dosages (1125 µg/kg), did not affect blood gases and blood-glucose (n=5 animals; p>0.05).

RNase Therapy Assessed by Magnetic Resonance Imaging

Parametric and non-parametric data were compared using one-way analysis of variance and Kruskal-Wallis-test or using Student's t-test and Mann-Whitney u-test.

All data are presented as mean±SD. A p-level <0.05 was considered statistically significant.

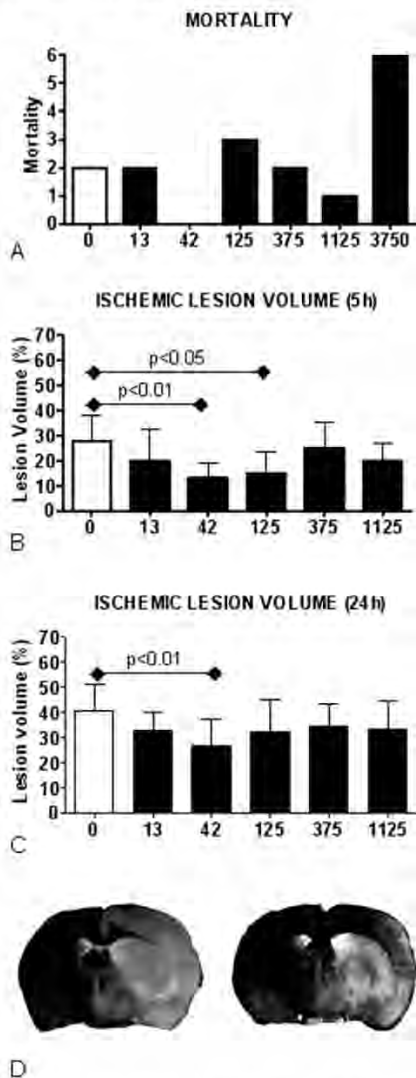


Fig. (2). RNase 1 dose-effect relationship: mortality and infarct volume.

RNase 1-treatment reduces ischemic lesion volume and edema formation.

(A) Mortality rate (in number of animals) in relation to the RNase 1 dose injected. In all groups the mortality rate was within the usual complication rate of the stroke model used, but increased sharply at the highest dose (67% at 3750 µg/kg). (B) + (C): Mean ischemic lesion volume (expressed in percent of the hemisphere) after 5 h and 24 h after middle cerebral artery occlusion. The mean ischemic lesion volume in animals treated with 42 µg/kg as compared to placebo was significantly reduced 5h and 24h after MCAO. (D) T2-imaging of representative animals (left untreated, right RNase 1-treated) 24h after MCAO. Note the larger infarct and the more accentuated midline-shift in the untreated rat

Current Neurovascular Research, 2009, Vol. 6, No. 1 15

Dose-Effect Relationship

The mortality rate remained within the typical range of the model used (10%-15%) over a wide range of different dosages (13 µg/kg to 1125 µg/kg) but increased sharply at the highest dose (67% at 3750 µg/kg). Further investigation of this dose was therefore terminated. No animal died in the 42 µg/kg group (Fig. (2)).

RESULTS

Tolerability of RNase 1

Highly dosed intravenous RNase 1 (1125 µg/kg) was tolerated well. The treatment did not affect arterial blood pressure (p>0.05; Fig. (1)), blood gases or blood-glucose (see Table 2).

The mean ischemic lesion volume, as determined on MRI at time point 5 h, was significantly reduced in animals treated with 42 µg/kg RNase 1 (13.0% ± 6.1%; p<0.01) and

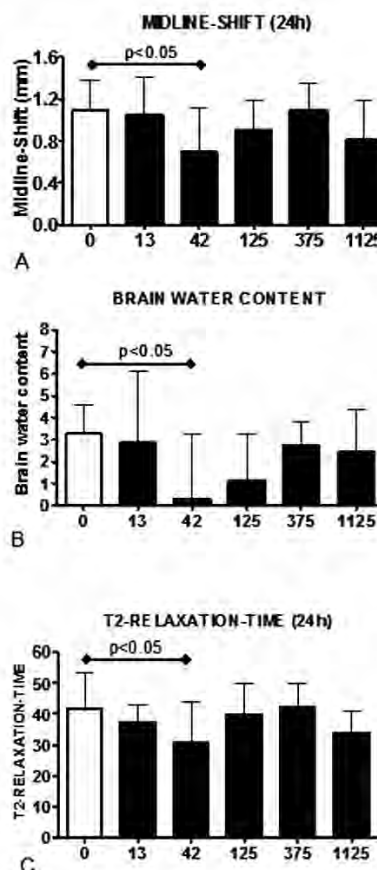


Fig. (3). RNase 1 dose-effect relationship: brain edema.

(A) Midline shift (expressed as the lateral displacement of the 3rd ventricle in mm) after 24 h. (B) Increase in brain water content (expressed as the difference of absolute brain water content between both hemispheres) as determined by the wet-dry method. (C) T2-relaxation time, a parameter that reflects brain water content, measured in regions of interest (expressed as side-to-side-difference in ms). All three methods used indicate a significant reduction of brain edema in rats treated with RNase 1.

125 µg/kg RNase 1 ($14.7\% \pm 8.9\%$; $p < 0.05$) as compared to placebo ($27.7\% \pm 10.3$). Other dosages did not significantly affect infarct volume. The mean ischemic lesion volume 24 h after MCAO was only significantly reduced in animals subjected to 42 µg/kg ($26.7\% \pm 10.7\%$; $p < 0.01$) compared to placebo ($41.0\% \pm 10.3\%$) (Fig. (2)). Clinical scores at 70 min, 3 h and 24 h after MCAO, did not differ among the groups ($p > 0.05$).

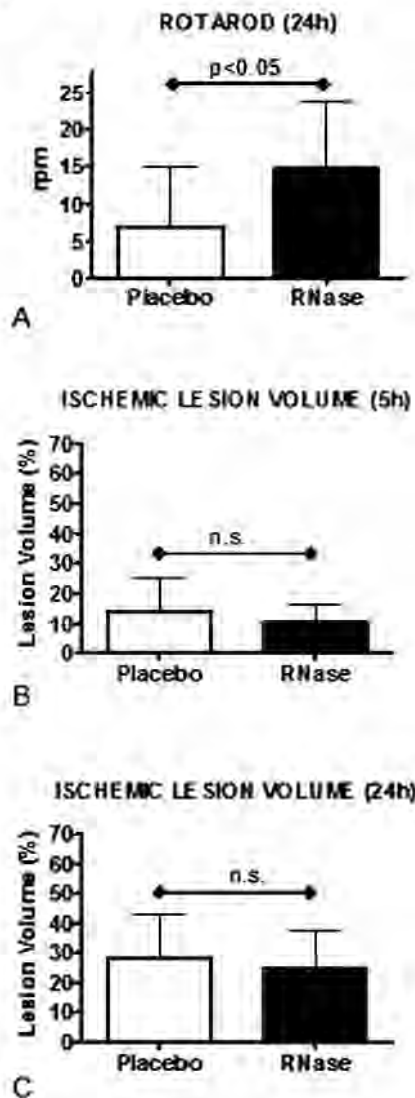


Fig. (4). Impact of hemiraniectomy on the neuroprotective properties of RNase 1.

RNase 1-treatment in craniectomized animals shows no reduction in ischemic lesion volume.

(A) Rotarod test (expressed as the maximum speed tolerated in rounds per min) in craniectomised animals. Animals treated with RNase 1 showed a significantly better performance on the Rotarod as compared to placebo-treated rats. (B) and (C) Mean ischemic lesion volume (expressed in percent of the hemisphere) 5 h and 24 h after middle cerebral artery occlusion in craniectomised animals. In craniectomised animals ischemic lesion volume was not reduced by RNase 1 treatment.

A marked reduction of brain edema formation was detected in animals treated with 42 µg/kg RNase 1. Other dosages showed a non-significant trend towards edema reduction. This edema-protective effect was assessed using three different methods (Fig. (3)):

- (a) The midline-shift was significantly reduced after 24 h in treated animals ($0.69 \text{ mm} \pm 0.42 \text{ mm}$) as compared to placebo ($1.09 \text{ mm} \pm 0.29 \text{ mm}$; $p < 0.05$).
- (b) Direct measurement of brain water content using the wet-dry-method indicated a significant decrease of edema formation in RNase 1-treated animals (0.3 ± 2.9) as compared to placebo (3.3 ± 1.3 ; $p < 0.05$).
- (c) RNase 1 treated animals showed a significant reduction of T2RT in ROI after 24 h ($p < 0.05$), indicating an attenuation of vasogenic brain edema formation independently from ischemic lesion size.

Impact of the Space-Occupying Effect of Edema Formation on the Neuroprotective Properties of RNase 1

As in the previous experiment, clinical scores did not differ between the groups ($p > 0.05$). However, animals treated with 42 µg/kg RNase 1 performed significantly better on the Rotarod (baseline, $22.2 \text{ rpm} \pm 6.4 \text{ rpm}$; 24 h, $14.8 \text{ rpm} \pm 9.0 \text{ rpm}$) as compared to placebo-treated rats (baseline, $23.1 \text{ rpm} \pm 7.2 \text{ rpm}$; 24 h, $6.9 \text{ rpm} \pm 8.1 \text{ rpm}$) (Fig. (4)).

As expected, MLS was not significantly different between both groups after 5 h and 24 h ($p > 0.05$). T2RT, however, was significantly reduced in RNase 1 treated animals within the ischemic lesion at both imaging time-points after ischemia ($p < 0.05$), indicating a reduction of vasogenic brain edema. Accordingly, RNase 1 treatment led to a significant reduction of brain water content as determined by the wet-dry-technique (RNase 1: -0.4 ± 1.4 ; placebo: 1.3 ± 2.5 ; $p < 0.05$) (Fig. (5)).

Importantly, despite this marked reduction of edema formation, ischemic lesion volume was not reduced by RNase 1 treatment (RNase 1, 5 h: $10.2\% \pm 5.9\%$; 24 h: $24.4\% \pm 13.1\%$; placebo, 5 h: $13.8\% \pm 11.5\%$; 24 h: $27.8\% \pm 15.0\%$; $p > 0.05$) (Fig. (4)).

In four animals no ischemic lesion was detectable after 24 h. Another animal displayed subarachnoidal hemorrhage on autopsy. Two more animals died prior to protocol completion. These 7 animals were excluded from statistical evaluation and replaced. All remaining animals displayed contralateral hemiparesis during clinical evaluation and revealed no hemorrhagic complications on T2*-imaging and autopsy.

DISCUSSION

Focal cerebral ischemia leads to cell necrosis and thus to the release of plasmatic nucleic acids into the vicinity of the lesion. Recent studies indicated that extracellular nucleic acids, particularly RNA, present various and hitherto unrecognized biological activity (Fischer *et al.*, 2007; Nakazawa *et al.*, 2005; Kannemeier *et al.*, 2007). *in vitro* studies demonstrated that RNA increases permeability in blood-brain barrier models. This effect is accompanied by topographical alterations of tight junction proteins and VE-

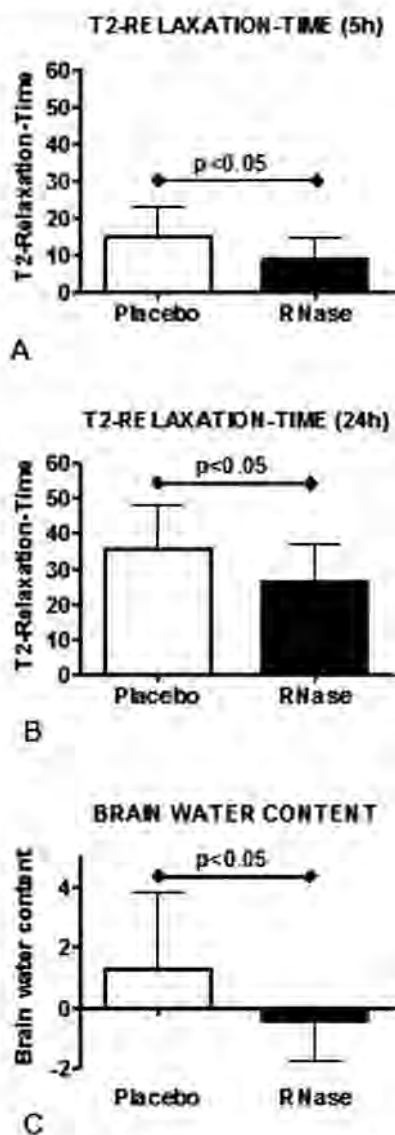


Fig. (5). Impact of the hemicraniectomy effect on the edemaproductive properties of RNase 1. (A) and (B): T2-relaxation time measured in regions of interest (expressed as side-to-side-difference in ms) in craniectomised animals (C) Increase in brain water content (expressed as the difference of absolute brain water content between both hemispheres) determined by the wet-dry method. Both methods indicated a significant reduction of vasogenic brain edema by RNase 1 treatment.

cadherin and is mediated by interactions between RNA and extracellular bound, leading to the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-receptor 2 followed by intracellular signaling. *In vitro* and *in vivo* studies furthermore have shown that RNA-induced hyperpermeability of the BBB can be counteracted by RNase 1 (Fischer *et al.*, 2007). First *in vivo* experiments using a rat model for focal cerebral ischemia provided evidence for a substantial edema-protective effect of intravenously applied RNase (Fischer *et al.*, 2007). Surprisingly, these previous experiments also

indicated a potential neuroprotective effect of RNase 1-treatment.

In the present report we demonstrate that intravenous RNase 1 application is well tolerated in the rat model used. Even relatively high doses (1125 µg/kg) did not affect physiological parameters. Merely excessively high doses (3750 µg/kg) gave rise to an increased mortality rate. Although our studies were not designed to determine the LD50-dose, we can expect this threshold between 1125 µg/kg and 3750 µg/kg and thus being approximately 27 to 90 times higher than the most effective therapeutical dose of 42 µg/kg (see below).

As expected from previous observations, RNase 1 treatment strongly reduced vasogenic edema formation and ischemic lesion volume *in vivo*. The present results indicate that this effect is dose-dependent with an optimum about 40 µg/kg. Higher or lower dosages were less or not effective. Interestingly, the maximal effects for neuroprotection and for edema protection were achieved with the same dose (42 µg/kg), suggesting the underlying mechanisms being mutually dependent. Quantification of edema, however, can potentially be biased by the volume of the infarcted tissue, because large infarcts result in higher hemispheric brain water content. This could affect quantification techniques that assess total hemispheric edema volume, i.e. the wet/dry-method and (to some extent) the midline-shift quantification. Thus, edema was additionally quantified on MRI using T2RT-measurements in regions of interest – a method being largely independent of ischemic lesion size (Gerriets *et al.*, 2005). Since the results provided by T2RT-quantification are in accordance with midline-shift- and wet-dry-measurements, we concluded that RNase 1 truly reduces vasogenic edema formation and not merely infarct size. Pathological conditions leading to cell necrosis (i.e. stroke or trauma) might lead to the release of intracellular RNA. RNase 1, released from vascular endothelial cells (Landre *et al.*, 2002) might degrade RNA, thus preventing RNA-induced permeability changes, which were provoked by an indirect of RNA caused by its polyanionic character. RNA leads to the mobilization of extracellular bound VEGF, thus increasing its binding to VEGF-R2. Accordingly, RNA-induced edema formation *in vivo* was not only prevented by RNase 1- but also by anti-VEGF antibody pretreatment (Fischer *et al.* 2007). VEGF, known as a hypoxia-inducible protein, has already been demonstrated to induce hypoxia- and tumor-induced edema formation (Schoch *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 1997).

The fate of patients suffering from large territorial stroke is critically determined by the amount of vasogenic brain edema formation, since the resulting space-occupying effect causes displacement of brain structures, an increase of intracranial pressure and - not uncommonly - cerebral herniation and death. Decompressive hemicraniectomy has been shown to save these patients' lives (Schwab *et al.*, 1998; Wirtz *et al.*, 1997). This procedure includes the removal of a large bone flap (parts of the os frontale, os temporale and os parietale) and a duraplasty and results in a marked decrease of intracranial pressure. Large clinical trials recently demonstrated that this intervention reduces mortality from 71% to 22% (Vahedi *et al.*, 2007). Animal studies furthermore indicate that hemicraniectomy is also a

strong neuroprotective measure, since it significantly reduces infarct size if performed early (Engelhorn *et al.*, 1999; Doerfler *et al.*, 2001; Forsting *et al.*, 1995) or even with up to 12 h delay after MCAO (Engelhorn *et al.*, 2002). A seven-fold increase of the number of patients with excellent functional outcome one year after surgery – as seen in a recent meta-analysis of 3 European clinical trials – provides further evidence that the neuroprotective effect of hemicraniectomy might be of clinical relevance (Vahedi *et al.*, 2007).

In search of the underlying mechanism of this neuroprotective effect, several authors describe an improvement of regional cerebral blood flow within the hypoperfused ischemic penumbra following surgical decompression, most likely as a result of a release of mechanical compression onto the microcirculation and probably onto pial vessels and/or the venous drainage (Engelhorn *et al.*, 1999; Hofmeijer). These findings lead to the assumption that surgical or pharmacological edema-reducing treatment might attenuate the collateral damages of the space-occupying effect in large ischemic stroke and thus indirectly acts neuroprotective (Walberer *et al.*, 2008).

Since RNase 1 treatment reduces vasogenic edema formation and the subsequent space-occupying effect, we hypothesized that its neuroprotective (i.e. infarct reducing) activity is mediated indirectly rather than by direct effects on neurons. In our experiments animals underwent bilateral craniectomy prior to MCA-occlusion. This procedure virtually eliminates the space-occupying effect of edema formation (Walberer *et al.*, 2008). As expected, RNase 1-treatment significantly reduces vasogenic edema (as determined by T2RT- and wet-dry-measurements) but not midline-shift, since the swollen brain could expand through the large bone defect. Importantly, 42 µg/kg RNase 1 did *not* reduce ischemic lesion volume in this setting. This finding provides further evidence that the neuroprotective effect of RNase 1 is largely brought about *indirectly* by reducing the space-occupying effect and not by direct protection onto neurons or glia cells.

The present study certainly has some limitations: Firstly, the neuroprotective effect of RNase 1 treatment was defined by a reduction in infarct size. Clinical testing did not indicate a statistically significant functional improvement. This finding might reflect the limited sensitivity of standardized clinical evaluation used in the present study. Secondly, the effect of RNase 1 has been tested in a pre-treatment setting, which is sufficient for a proof of principle. Further studies, however, are required to determine the efficiency of delayed RNase 1 application, which is clinically more relevant. Furthermore, studies in different species and ischemia models (i.e. permanent vessel occlusion) and a thorough toxicological workup certainly are required before a clinical evaluation of an RNase 1 therapy can be considered (STAIR, 1999).

To summarize, the present work indicates that the neuroprotective properties of RNase 1 treatment are predominantly mediated by its anti-edemous effects that have reduced mechanical compression on the “tissue at risk” and therefore might have improved regional cerebral blood flow. This phenomenon could be denominated as “secondary neuroprotection”, and might also be relevant for other

neuroprotective agents helping to maintain blood-brain barrier functions.

Furthermore, RNA-mediated toxicity might also be relevant in other pathological conditions, such as brain tumors, head trauma and many neuroinflammatory and neurodegenerative diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was generously supported by the Willy Robert Pitzer Foundation (AZ8006) and by the Kerckhoff Clinic Bad Nauheim.

We wish to thank Prof. Dr. Rudolf Graf, Max Planck Institute for Neurological Research, Cologne, Germany for his thoughtful suggestions and comments.

REFERENCES

- Bientema, JJ. (1998) Introduction: The ribonuclease A superfamily. *Cell Mol Life Sci* **54**: 763-765.
- Bläser, J, Triebel, S, Kopp, C, Tschesche, H. (1993) A highly sensitive immunoenzymometric assay for the determination of angiogenin. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **31**: 513-516.
- Doerfler, A, Schwab, S, Hoffmann, TT, Engelhorn, T, Forsting, M. (2001) Combination of decompressive craniectomy and mild hypothermia ameliorates infarction volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke* **32**: 2675-2681.
- Engelhorn, T, Doerfler, A, Kastrup, A, Beaulieu, C, de Crespigny, A, Forsting, M, Moseley, ME, Faraci, FM. (1999) Decompressive craniectomy, reperfusion, or a combination for early treatment of acute “malignant” cerebral hemispheric stroke in rats? Potential mechanisms studied by MRI. *Stroke* **30**: 1456-1463.
- Engelhorn, T, von Kummer, R, Reith, W, Forsting, M, Doerfler, A. (2002) What is effective in Malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* **33**: 617-622.
- Faden, AI, Stoica, B. (2007) Neuroprotection: challenges and opportunities. *Arch Neurol* **64**: 794-800.
- Fischer, S, Gerriets, T, Wessels, C, Walberer, M, Kostin, S, Stolz, E, Zheleva, K, Hocke, A, Hippenstiel, S, Preissner, KT. (2007) Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability *via* vascular endothelial growth factor. *Blood* **110**: 2457-2465.
- Forsting, M, Reith, W, Schäbitz, WR, Heiland, S, von Kummer, R, Hacke, W, Sartor, K. (1995) Decompressive craniectomy for cerebral infarction. An experimental study in rats. *Stroke* **26**: 259-264.
- Gaur, D, Swaminathan, S, Batra, JK. (2001) Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor: generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J Biol Chem* **276**: 24978-24984.
- Gerriets, T, Stolz, E, König, S, Babacan, S, Fiss, I, Jauss, M, Kaps, M. (2001) Sonographic monitoring of midline shift in space-occupying stroke: an early outcome predictor. *Stroke* **32**: 442-447.
- Gerriets, T, Stolz, E, Mondrau, B, Fiss, I, Seidel, G, Kaps, M. (1999) Sonographic monitoring of midline shift in hemispheric infarctions. *Neurology* **52**: 45-49.
- Gerriets, T, Stolz, E, Walberer, M, Müller, C, Rottger, C, Kluge, A, Kaps, M, Fisher, M, Bachmann, G. (2004) Complications and pitfalls in rat stroke models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* **35**: 2372-2377.
- Gerriets, T, Stolz, E, Walberer, M, Müller, C, Kluge, A, Bachmann, A, Fisher, M, Kaps, M, Bachmann, G. (2004) Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke* **35**: 566-571.
- Goldman, CK, Bharara, S, Palmer, CA, Vitek, J, Tsai, JC, Weiss, HL, Gillespie, GY. (1997) Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth-factor expression. *Neurosurgery* **40**: 1269-1277.
- Hamm, RJ, Pike, BR, O'Dell, DM, Lyeth, BG, Jenkins, LW. (1994) The Rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor

RNase Therapy Assessed by Magnetic Resonance Imaging

- deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **11**: 187-196.
- Hofmeijer, J, Schepers, J, Veldhuis, WB, Nicolay, K, Kappelle, LJ, Bär, PR, van der Worp, HB. (2004) Delayed decompressive surgery increases apparent diffusion coefficient and improves peri-infarct perfusion in rats with space-occupying cerebral infarction. *Stroke* **35**: 1476-1481.
- Kannemeier, C, Shibamiya, A, Nakazawa, F, Trusheim, H, Ruppert, C, Markart, P, Song, Y, Tzima, E, Kennerknecht, E, Niepmann, M, von Bruehl, ML, Sedding, D, Massberg, S, Günther, A, Engelmann, B, Preissner, KT. (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 6388-6393.
- Landre, JBP, Hewett, PW, Olivot, JM, Friedl, PYL, Sachinidis, A, Moenner, M. (2002) Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem* **86**: 540-552.
- Nakazawa, F, Kannemeier, C, Shibamiya, A, Song, Y, Tzima, E, Schubert, U, Koyama, T, Niepmann, M, Trusheim, H, Engelmann, B, Preissner, KT. (2005) Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J* **385**: 831-838.
- Pullicino, PM, Alexandrov, AV, Shelton, JA, Alexandrova, NA, Smurawska, LT, Norris, JW. (1997) Mass effect and death from severe acute stroke. *Neurology* **49**: 1090-1095.
- Savitz, SI, Fisher, M. (2007) Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of SAINT trials. *Ann Neurol* **61**: 396-402.
- Schoch, HJ, Fischer, S, Marti, HH. (2002) Hypoxia-induced VEGF expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* **125**: 2549-2557.

Current Neurovascular Research, 2009, Vol. 6, No. 1 19

- Schwab, S, Steiner, T, Aschoff, A, Schwarz, S, Steiner, HH, Jansen, O, Hacke, W. (1998) Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. *Stroke* **29**: 1888-1893.
- Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). (1999) Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development. *Stroke* **30**: 2752-2758.
- Vahedi, K, Hofmeijer, J, Juettler, E, Vicaut, E, George, B, Algra, A, Amelink, GJ, Schmiedeck, P, Schwab, S, Rothwell, PM, Boussier, MG, van der Worp, HB, Hacke, W, DECIMAL DESTINY HAMLET Investigators. (2007) Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol* **6**: 215-222.
- Walberer, M, Blaes, F, Stolz, E, Mueller, C, Schoenburg, M, Tschernatsch, M, Bachmann, G, Gerriets, T. (2007) Midline-shift corresponds to the amount of brain edema early after hemispheric stroke--an MRI study in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* **19**: 105-110.
- Walberer, M, Ritschel, N, Nedelmann, M, Volk, K, Mueller, C, Tschernatsch, M, Stolz, E, Blaes, F, Bachmann, G, Gerriets, T. (2008) Brain Swelling Aggravates Infarct Formation in Large Territorial Stroke - A Target for Neuroprotection? *J Neurosurg* **109**: 287-293.
- Weickmann, JL, Olson, EM, Glitz, DG. (1984) Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res* **44**: 1682-1687.
- Wirtz, CR, Steiner, T, Aschoff, A, Schwab, S, Schnippering, H, Steiner, HH, Hacke, W, Kunze, S. (1997) Hemicraniectomy with dural augmentation in medically uncontrollable hemispheric infarction. *Neurosurg Focus* **15**: E3.