

**Effekte von lokaler Hypothermie und der Kombination
von lokaler Hypothermie mit Sauerstofftherapie in
einem tierexperimentellen Schlaganfallmodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dr. med. univ. Ebner, Matthias

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Ziemann

2. Berichterstatter: Juniorprofessor Dr. H. Langer

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1. Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls	1
1.2. Ätiologische Einteilung der Schlaganfallerkrankung	2
1.3. Neuroprotektive Therapiestrategien beim ischämischen Schlaganfall	2
1.4. Therapeutische Hypothermie	4
1.4.1. Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion	5
1.4.1. Zieltemperatur von therapeutischer Hypothermie	5
1.4.2. Nebenwirkungen von therapeutischer Hypothermie	6
1.4.3. Zeitfenster von therapeutischer Hypothermie	8
1.4.4. Kühlgeschwindigkeit konventioneller Kühlmethoden	8
1.5. Selektive Hirnkühlung	10
1.5.1. Methoden der selektiven Hirnkühlung	11
1.5.2. Intra-arterielle kalte Infusionen	12
1.5.2.1. Computersimulationen beim akutem Schlaganfall	13
1.5.2.2. Anwendbarkeit beim Menschen	14
1.5.3. Tierexperimentelle Daten zu AI bei akutem Schlaganfall	15
1.5.3.1. Pre-reperfusion Flushing	15
1.5.3.2. Kalte intra-arterielle Infusionen	16
1.5.3.3. Limitationen der bisherigen tierexperimentellen Datenlage	18
1.6. Hyperoxygenierung	18
1.6.1. Mechanismen der Neuroprotektion durch Hyperoxygenierung	19
1.6.2. Klinische Erfahrungen mit Hyperoxygenierung bei Schlaganfall	20
1.6.3. Nebenwirkungen von Hyperoxygenierung	22
1.7. Kombinationstherapie mit Hypothermie und Hyperoxygenierung	23
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1. Tierexperimentelle Versuche	25

2.2. Versuchsgruppen	25
2.3. MCAO Modell an der Ratte	26
2.4. Funktionelle Testung der Versuchstiere	29
2.5. Gewichtsverlust	30
2.6. Infarkt volumen und Ödemvolumen	31
2.7. Statistische Methoden	31
3. ERGEBNISSE	32
3.1. Ausgangsgewicht und MCAO Qualität	33
3.2. Infarkt volumen	33
3.3. Ödemvolumen	36
3.4. Gewichtsverlust	38
3.5. Funktionelle Testergebnisse	38
3.6. Vitalparameter	41
4. DISKUSSION	52
4.1. Gewähltes Operationsmodell	52
4.2. Einfluss des verwendeten Atemgases auf die arteriellen Blutgase	53
4.3. Therapieeffekte von AI	54
4.3.1. Neuroprotektion durch körperwarme AI	54
4.3.2. Temperaturabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte von AI	56
4.4. Therapieeffekte von NBO	58
4.5. Therapieeffekte der Kombinationstherapie	58
4.5.1. Neuroprotektive Wirksamkeit	59
4.5.2. Sicherheitsaspekte	60
4.6. Limitationen der Studie	61

4.7. Klinische Relevanz der Ergebnisse	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	63
6. LITERATURVERZEICHNIS	65
7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	76
8. VERÖFFENTLICHUNGEN	77

Abkürzungsverzeichnis

ACM	Arteria cerebri media
AI	Intra-arterielle Infusionen
atm	Physikalische Atmosphäre (1013,25 mär)
Ca	Kalzium
Hb	Hämoglobin
Hct	Hämatokrit
HF	Herzfrequenz
i.v.	intravenös
K	Kalium
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
MAP	Arterieller Mitteldruck (Middle Arterial Pressure)
MCAO	Verschluss der Arteria cerebri media (Middle Cerebral Artery Occlusion)
MMP-2/9	Matrix Metalloproteinasen 2 und 9
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
NO	Stickstoffmonoxid
Na	Natrium
NBO	Normobare Oxygenierung
HBO	Hyperbare Oxygenierung
NIH	National Institute of Health
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
P ₅₀	Partialdruck bei dem 50% Sättigung erreicht wird
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
rt-PA	Rekombinanter Gewebe-Plasminogen Aktivator
SpO ₂	Sauerstoffsättigung
SAP	Systolischer arterieller Druck
T _{rect}	Rektale Körpertemperatur

TTC

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls

Auf der Grundlage von Registern und prospektiven Kohortenstudien ist anzunehmen, dass in Deutschland jedes Jahr mehr als 260.000 Menschen einen Schlaganfall erleiden.¹ Dabei nimmt die Prävalenz der Erkrankung mit dem Alter zu: Während Schlaganfälle bei einem Alter unter 40 Jahren nur selten auftreten, liegt die Prävalenz in der Altersgruppe von 40-79 Jahren bei insgesamt 2,9%. Betrachtet man die Altersgruppe zwischen 70 und 79 Jahren isoliert, findet sich hier eine Prävalenz von 7,1%.² Aufgrund des zu erwarteten demographischen Wandels und dem damit verbundenen Anstieg des Bevölkerungsalters ist deshalb davon auszugehen, dass die Inzidenz der Schlaganfallerkrankung in den nächsten Jahren deutlich zunehmen wird. Eine Studie aus dem Jahr 2008 prognostiziert beispielsweise im Bundesstaat Hessen bis 2050 eine Steigerung der Inzidenz um 68%.³

Obwohl es in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Zunahme der Lebenserwartung von Schlaganfallpatienten* gekommen ist⁴, stellt der Schlaganfall in Deutschland und anderen Industrienationen weiterhin die zweithäufigste Todesursache dar.⁵ Zudem führt die Erkrankung bei mehr als 60% der Betroffenen zu bleibenden funktionellen Defiziten, die bei einem Viertel aller Patienten eine mäßige bis schwere bleibende Behinderung darstellen.⁶ Der Schlaganfall ist damit in westlichen Industrienationen der häufigste Grund für eine dauerhafte Behinderung überhaupt und die drittgrößte Ursache einer Reduktion an *disability adjusted life years* (DALYs).⁷

Die häufigen chronischen Beeinträchtigungen bedeuten zudem nicht nur einen wesentlichen Einschnitt in die Lebensqualität der Betroffenen, sondern führen auch zu einer beträchtlichen sozioökonomischen Belastung für das Gesundheitssystem. Eine Studie aus dem Jahr 2004 veranschlagte die Langzeitkosten für die Versorgung eines Schlaganfalls auf mehr als 43.000 Euro, was insgesamt zu einer jährlichen Belastung des deutschen Gesundheitssystems von 7,1 Milliarden Euro führt.⁸ Es ist zu erwarten, dass durch die prognostizierte Alterung der Bevölkerung die Auswirkungen des

* Die Termini „(Schlaganfall)patienten“ und „Probanden“ schließen im Folgenden immer auch

Schlaganfalls auf das Gesundheitssystem in den nächsten Jahren noch weiter zunehmen werden. Unter Berücksichtigung dieser Veränderungen werden die Gesamtkosten aller zwischen 2006 und 2025 auftretenden Schlaganfälle in Deutschland auf 108,6 Milliarden Euro geschätzt.⁸

1.2. Ätiologische Einteilung der Schlaganfallerkrankung

Die *World Health Organisation* definiert Schlaganfälle als neurologisches Defizit cerebrovaskulärer Ursache, das für mindestens 24 Stunden andauert.⁹

Dieser symptomatischen Definition entsprechend werden Schlaganfälle aufgrund ihrer Genese in zwei Hauptgruppen unterteilt:

In circa 15% der Fälle kommt es zu hämorrhagischen Schlaganfällen, die durch intrakranielle Blutungen ausgelöst werden.¹⁰

Den weitaus größten Teil (ca. 85%) aller Schlaganfälle machen ischämische Schlaganfälle aus, bei denen ein Verschluss der hirnversorgenden Blutgefäße zu Grunde liegt.¹⁰ Ischämische Schlaganfälle werden hinsichtlich der Ursache des Gefäßverschlusses bislang anhand der *Trial of ORG10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) Klassifikation eingeteilt: (1) Infarkte makroangiopathischer Genese (Arteriosklerose großer Gefäße), (2) kardioembolische Infarkte, (3) lakunäre Infarkte (Verschluss kleiner Gefäße) (4) Infarkte anderer, geklärter Genese und (5) Infarkte ungeklärter Genese.¹¹

Hämorrhagische und ischämische Schlaganfällen unterscheiden sich deutlich in ihren pathophysiologischen Mechanismen und ihrer Therapie.¹² In dieser Arbeit wird im Folgenden nur auf den ischämischen Schlaganfall eingegangen.

1.3. Neuroprotektive Therapiestrategien beim ischämischen Schlaganfall

Die frühzeitige Wiederherstellung der Blutversorgung durch intravenöse Thrombolyse mit rekombinantem Gewebe-Plasminogen Aktivator (rt-PA) in den ersten 4,5 Stunden nach Symptombeginn stellt derzeit die einzige evidenzbasierte neuroprotektive Akutintervention beim ischämischen Schlaganfall dar.¹³ Allerdings beschränken das enge therapeutische Zeitfenster und die strengen Zulassungskriterien die Anwendbarkeit dieser Therapie auf eine Minderheit (10-13%) der betroffenen Patienten.¹⁴

Trotz intensiver Anstrengungen waren bei der Suche nach neuroprotektiven Therapieoptionen bisher keine Erfolge zu verzeichnen. Eine besondere Herausforderung stellt die komplexe Pathophysiologie des Schlaganfalls dar. Durch eine Unterbrechung der cerebralen Blutversorgung kommt es sowohl während der Ischämiephase (verminderte Durchblutung) als auch -im Fall eines transienten Gefäßverschlusses- in der Reperfusionphase (Wiedereinstömen von Blut in das betroffene Hirnparenchym) zu neuronaler Schädigung. Die Wichtigkeit des Reperfusionsschadens in diesem Prozess konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden. Hier führte prolongierte transiente Ischämie gefolgt von Reperfusion zu signifikant größeren Infarktvolumina als permanente Ischämie über den gleichen Zeitraum.^{15,16}

Bei der Entwicklung von Zellschäden nach einem Gefäßverschluss spielt eine Reihe von vernetzten Schädigungskaskaden eine wesentliche Rolle, die zu verschiedenen Zeitpunkten Relevanz erlangen. Zu den wichtigsten pathophysiologischen Prozessen zählen neben der direkten ischämischen Zellschädigung durch Sauerstoff- und Glukosemangel, Exzitotoxizität, Peri-Infarkt Depolarisation, Inflammation und reaktive Apoptose- und Nekrose.¹⁷ Es gibt dabei keine Hinweise darauf, dass einem dieser Mechanismen eine übergeordnete Rolle zukommen würde.¹⁸

Ein weiterer komplizierender Faktor ist die inhomogene Verteilung der Geschwindigkeit mit der Zelltod in verschiedenen Teilen des ischämischen Gewebes eintritt: In der von der Ischämie am stärksten betroffenen Zone, dem Infarktkern, beginnen Neurone innerhalb weniger Minuten abzusterben. Diese Zone ist umgeben von einer initial oft wesentlich größeren Randzone, der Penumbra. In diesem Gebiet ist zunächst nur die Funktion der betroffenen Neurone durch die Hypoperfusion eingeschränkt.¹⁹ Erst wenn die ischämischen Bedingungen persistieren kommt es auch in der Penumbra zu irreversibler Zellschädigung und zum Absterben von Neuronen. Dies führt zu einer stetigen Ausdehnung des Infarktkerns und einem Schrumpfen der Penumbra. Während ein Großteil des rettbaren Gewebes innerhalb der ersten 4 bis 6 Stunden verloren geht, konnte in Studien bis zu 24 Stunden nach Infarktbeginn rettbares Gewebe in den peripheren Anteilen der initialen Penumbra nachgewiesen werden.^{20,21}

Die beschriebene Komplexität der pathophysiologischen Mechanismen ist ein wesentlicher Grund dafür, dass über 1000 therapeutische Interventionen die auf ihre neuroprotektive Wirksamkeit beim Schlaganfall getestet wurden scheiterten und nur

rt-PA in die klinische Standardversorgung integriert werden konnte.¹⁸ Dabei besteht eine auffällige Diskrepanz zu den vielversprechenden Ergebnissen präklinischer Experimente, die für 62% dieser Substanzen neuroprotektive Wirksamkeit zeigten.^{18,22} Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Mehrzahl der getesteten Therapien hochspezifisch einen einzelnen Teil der ischämischen Schädigungskaskade beeinflussen sollten – ein Vorgehen das unter streng kontrollierten und für die jeweilige Intervention optimierten Laborbedingungen oft erfolgreich war. Solche Versuchsbedingungen spiegeln die wirklichen klinischen Verhältnisse allerdings nur unzureichend wider, in der eine Vielzahl von Infarktsyndromen, Ausprägungen, Zeitfenstern und unterschiedlichen Reperfusionverhältnissen auftreten. Unter diesen inhomogenen Bedingungen ist die selektive Hemmung eines einzelnen Schädigungsmechanismus vermutlich nicht ausreichend.¹⁸ In der Hoffnung auf robustere Wirkeffekte konzentrieren sich neue Ansätze deshalb vorrangig auf die Untersuchung von multimodal wirkenden Therapieoptionen, die mehrere Teile der Schädigungskaskade beeinflussen.^{23,24} Zwei dieser multimodal wirkenden Therapieansätze sollen im Folgenden detaillierter besprochen werden: Therapeutische Hypothermie und Sauerstofftherapie.

1.4. Therapeutische Hypothermie

Unter therapeutischer Hypothermie versteht man das Absenken der Körpertemperatur auf Werte unterhalb des physiologischen Bereichs. Die therapeutischen Effekte von Hypothermie wurden in den letzten 75 Jahren bei einer Reihe von Krankheitsbildern untersucht, bei denen es im Rahmen von akuter Hirnschädigung zu Ischämie- und Reperusionsbedingungen kommt.²⁵ Bei zwei Formen der globalen hypoxischen Hirnschädigung, der globalen cerebralen Ischämie nach Herz-Kreislaufstillstand und der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie bei Neugeborenen, konnte die neuroprotektive Wirksamkeit von therapeutischer Hypothermie bereits durch prospektive randomisierte Studien belegt werden.²⁶⁻²⁸ Der Einsatz von Hypothermie wird für diese beiden Indikationen auch in aktuellen klinischen Leitlinien empfohlen.^{29,30}

Die Ergebnisse zahlreicher präklinischer Studien weisen darauf hin, dass eine Anwendung von Hypothermie auch bei der fokalen ischämischen Hirnschädigung

(Schlaganfall) von Vorteil sein könnte. So zeigte eine aktuelle Metaanalyse von über 100 tierexperimentellen Studien, dass die Induktion von Hypothermie beim akuten Schlaganfall das resultierende Infarktvolumen um durchschnittlich 44% reduziert.³¹

1.4.1. Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion

Der Effekt von Hypothermie auf den zellulären Metabolismus und Sauerstoffverbrauch spielt eine zentrale Rolle für die neuroprotektive Wirkung: So vermindert eine Reduktion der Hirntemperatur um nur 1°C den cerebralen Sauerstoffverbrauch um 5% und erhöht so die Toleranz des neuronalen Gewebes für ischämisch/hypoxische Bedingungen.³² Zusätzlich zu dieser depressiven Wirkung auf den zellulären Metabolismus beeinflusst Hypothermie auch eine Vielzahl von intra- und extrazellulären Signalwegen. In der Akutphase eines Schlaganfalls (Minuten-Stunden) wirkt Hypothermie regulierend auf den zellulären Elektrolyt- und Energiehaushalt, die Glutamatfreisetzung und Kalzium-Distribution und beeinflusst die Induktion von Zelltod durch Apoptose.^{33,34} Viele dieser Signalwege sind nicht nur während der ischämischen Phase von Bedeutung, sondern spielen auch eine zentrale Rolle falls es zu einer Wiederherstellung der Blutversorgung im ischämischen Areal kommt (Reperfusion).³³

Neben den genannten Einflüssen zeigt Hypothermie auch während der subakuten Schädigungsphase (Stunden-Tage) protektive Wirkung. Hier kommt es vor allem zu einer Inhibierung der Entzündungsreaktion im ischämisch geschädigten Gewebe und zu einer verbesserten Integrität der Blut/Hirn Schranke.³³

1.4.1. Zieltemperatur von therapeutischer Hypothermie

Die optimale Hirntemperatur zum Erreichen von Neuroprotektion bei fokaler cerebraler Ischämie war lange Zeit unklar.²⁵ Initial wurde auf Erkenntnisse zurückgegriffen, die bei herz- und neurochirurgischen Eingriffen mit komplettem Kreislaufstillstand gewonnen wurden. Um einem ischämisch/hypoxischen Hirnschaden vorzubeugen wird bei solchen Eingriffen die Körpertemperatur routinemäßig auf Werte zwischen 10 und 28°C abgesenkt.³⁵ Die Zeitspanne für die der Kreislauf ohne erhöhtes Risiko für Hirnschäden unterbrochen werden kann scheint hier in direkter Verbindung zur

Reduktion des Zellmetabolismus zu stehen und wird deshalb durch ein Absenken der Körpertemperatur von 5 min bei 37°C auf 45 min bei 10°C verlängert.^{35,36} Ähnliche Ergebnisse liefern mehrere Tierexperimente globaler oder schwerster fokaler cerebraler Ischämie, in denen niedrigere Körpertemperaturen mit stärkeren protektiven Effekten assoziiert waren.³⁷⁻³⁹

Bei Schlaganfällen, die meist zu einer wesentlich mildereren Hirnschädigung führen, scheint eine ähnlich lineare Korrelation zwischen Körpertemperatur und neuroprotektiver Wirkung nicht zu bestehen. Vielmehr deuten die Resultate tierexperimenteller Studien darauf hin, dass bei milder Hirnschädigung die verstärkten therapeutischen Effekte aggressiver Temperatursenkung durch zusätzliche Nebenwirkungen aufgewogen werden. In einem Rattenmodell transienter fokaler Ischämie konnte durch den experimentellem Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO) für 120 Minuten der ausgelöste neuronale Schaden durch ein Absenken der Körpertemperatur auf 30°C nicht signifikant besser therapiert werden als durch mildere Hypothermie mit 33°C. Zudem zeigte die 30°C-Gruppe vermehrt hämodynamische und respiratorische Instabilität und verlängerte Erholungszeiten nach den operativen Eingriffen.⁴⁰ Kollmar et al. testeten verschiedene Körpertemperaturen im Bereich zwischen 32 und 37°C auf ihre Wirksamkeit bei MCAO für 90 Minuten. Auch hier trat maximale Neuroprotektion bei Temperaturen von 33 bis 34°C auf, ein Absenken der Körpertemperatur auf niedrigere Werte (32°C) führte zu einem Verlust der neuroprotektiven Wirkung.⁴¹

1.4.2. Nebenwirkungen von therapeutischer Hypothermie

Die Ausprägung der Nebenwirkungen von therapeutischer Hypothermie wird wesentlich vom Ausmaß der Körpertemperatursenkung bestimmt und kann alle Organsysteme betreffen. Von wesentlicher Bedeutung sind Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem, die Entwicklung von Kältezittern, Immunsuppression, Gerinnungsstörungen, Elektrolytveränderungen und Störungen im Säure/Basen Haushalt.⁴² Viele dieser Nebenwirkungen treten erst auf, wenn bestimmte Körpertemperaturen unterschritten werden. Potentiell letale Ereignisse wie Herzrhythmusstörungen, treten beispielsweise erst bei Körpertemperaturen unter 30°C auf.³⁴ Da schwere Nebenwirkungen im Bereich der milden (34-36°C) oder moderaten

(32-34°C) Hypothermie wesentlich seltener auftreten, fokussierten sich die meisten experimentellen und klinischen Untersuchungen über die neuroprotektive Wirksamkeit von Hypothermie beim akuten Schlaganfall auf diesen Temperaturbereich.^{31,42} Beim Menschen sind bei Körpertemperaturen zwischen 32 und 36°C vor allem Kältezittern und Immunsuppression als Nebenwirkung von Relevanz.⁴³

Kältezittern ist eine physiologische Reaktion des Körpers auf das Unterschreiten einer Körpertemperatur von 35.5-36°C.⁴⁴ Bei einer Hypothermiebehandlung kommt es durch Kältezittern zu einer direkten und indirekten Reduktion der erwünschten neuroprotektiven Effekte: Durch die erhöhte Muskelaktivität kommt es zu einer Wiedererwärmung des Körpers, die der gewünschten Kühlung entgegenwirkt und das Erreichen der Zieltemperatur erschwert. Zusätzlich führt Kältezittern zu einer Erhöhung des Sauerstoffbedarfs der Muskulatur: Bei wachen Probanden, die auf eine Absenkung der Körpertemperatur um 1,3°C mit Kältezittern reagierten, wurde ein Anstieg des Gesamtsauerstoffverbrauchs um 110% gemessen.⁴⁵ Es wird vermutet, dass diese Erhöhung der muskulären Sauerstoffextraktion die hypoxischen Bedingungen in der Infarktzone zusätzlich verschlechtern könnte.⁴⁶

Während Kältezittern bei sediert-beatmeten Patienten leicht durch eine neuromuskuläre Blockade unterbunden werden kann, stellt die Behandlung bei den zumeist wachen Schlaganfallpatienten ein therapeutisches Problem dar. Zur Unterdrückung von Kältezittern bei wachen Patienten wurde in Studien zumeist eine Kombination der Medikamente Pethidin und Buspiron verwendet.^{43,47-49} Durch diese Therapie ließ sich nur eine begrenzte Symptomkontrolle erreichen. So berichten die Autoren der ICTuS-L Studie (der bisher größten Studie zur therapeutischen Hypothermie bei Schlaganfallpatienten), dass trotz Verwendung von sehr hohen Dosen von Pethidin (14.5±6.9 mg/kg) bei 4 von 28 Patienten unkontrollierbares Kältezittern das Erreichen der Zieltemperatur unmöglich machte.⁴³

Hochdosierte Pethidingaben führen häufig zu Sedierung und Atemdepression, zwei Nebenwirkungen die eine Aspiration begünstigen.⁴³ Dieses Risiko ist bei Schlaganfallpatienten von besonderer Relevanz, da diese häufig zusätzlich unter Dysphagie leiden.⁵⁰ Wenn es zur Aspiration kommt, besteht bei hypothermen Patienten aufgrund der immunsuppressiven Wirkung der Hypothermiebehandlung ein erhöhtes Risiko Pneumonien zu entwickeln.⁴² In der zitierten ICTuS-L Studie entwickelten 50%

der Patienten in der Hypothermie-Gruppe Pneumonien, während in der Kontrollgruppe nur 10% betroffen waren.⁴³ Die derzeitige Datenlage ist nicht ausreichend um diesen Unterschied auf die durch Hypothermie induzierte Immunosuppression, die vermehrte Aspiration durch die Pethidinbehandlung oder eine Kombination beider Faktoren zurückzuführen. Obwohl die Entwicklung einer Pneumonie in dieser Studie keinen Effekt auf des funktionelle Outcome nach 90 Tagen hatte⁴³ sind diese Ergebnisse besorgniserregend, da in größeren Studien ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Pneumonien und einer erhöhten Mortalität und schlechtem funktionellem Outcome nach Schlaganfall gezeigt werden konnte.^{51,52}

1.4.3. Zeitfenster von therapeutischer Hypothermie

Die stärksten neuroprotektiven Effekte lassen sich beobachten wenn mit der Anwendung von Hypothermie bereits vor oder kurz nach dem Beginn der Ischämie begonnen wird, und die hypothermen Temperaturen bis in die Reperfusionphase aufrechterhalten werden.⁵³ Wenn Hypothermie erst spät in der ischämischen Phase oder nach Wiederherstellung der Blutversorgung zur Anwendung kommt weisen Tierexperimente darauf hin, dass die Möglichkeit durch Hypothermie Neuroprotektion zu erreichen an ein enges Zeitfenster gebunden ist.³⁸ Dieses schmale therapeutische Fenster hat wichtige Konsequenzen für die Anwendung von Hypothermie in der klinischen Schlaganfallversorgung. Hier kommt es häufig zu einem um mehrere Stunden verzögerten Eintreffen der Patienten.⁵⁴ Kühlmethoden die ein möglichst rasches Absenken der Körpertemperatur erlauben sind deshalb für die erfolgreiche Anwendung von therapeutischer Hypothermie von größter Relevanz.

In Tierexperimenten können die neuroprotektiven Effekte von Hypothermie durch eine verlängerte Behandlungsdauer verstärkt und so therapeutische Zeitfenster erweitert werden.^{55,56} Die Anwendbarkeit von prolongierter Hypothermie beim Menschen wird jedoch durch eine erhöhte Komplikations- und Nebenwirkungsrate eingeschränkt.³⁴

1.4.4. Kühlgeschwindigkeit konventioneller Kühlmethoden

Etablierte Methoden zur klinischen Hypothermiebehandlung können in zwei unterschiedliche Kühltechniken unterteilt werden: Bei der Oberflächenkühlung wird die

Körperkerntemperatur nicht-invasiv durch Abwaschen mit kalten Flüssigkeiten oder Auflegen von Kühldecken und Kühl-Pads gesenkt. Endovaskuläre Kühlmethode verwenden intravenös (i.v.) platzierte Kühlkatheter oder kalte i.v. Infusionen um die Körpertemperatur invasiv zu senken. Beide Techniken führen zu einer nicht-selektiven Kühlung des Körpers: Körperkerntemperatur und Hirntemperatur werden also gleichermaßen reduziert (Ganzkörperkühlung).

Die Ergebnisse mehrerer Fallserien und kleiner klinischer Studien (n = 10-58) geben Hinweise auf die jeweiligen Vor- und Nachteile dieser beiden Techniken: Während Oberflächenkühlmethoden einfach anzuwenden sind und eine unmittelbare Therapieeinleitung ermöglichen, konnte in Studien die Zieltemperatur erst nach 2 oder mehr Stunden erreicht werden.⁵⁷⁻⁶⁰ Kürzere Zeiten zur Kühlinduktion wurden bei Verwendung von i.v. Kühlkathetern berichtet (64-126min).^{43,48,49,59} Allerdings kommt es durch die Notwendigkeit einer invasiven Platzierung des Katheters (zumeist in der V. cava inferior) zu einer Verlängerung der Zeitspanne zwischen Eintreffen des Patienten im Krankenhaus und der Einleitung der Kühlbehandlung. Dies betrifft insbesondere Schlaganfallpatienten die mit rt-PA behandelt werden. Um Blutungskomplikationen zu vermeiden wurde in Studien erst mindestens 30 Minuten nach Beendigung der rt-PA Infusion (Dauer=60 Minuten) mit der Anlage des Kühlkatheters begonnen.^{43,48} Insgesamt kam es dadurch zu einer Verzögerung des Beginns der Hypothermiebehandlung um mehr als 90 Minuten.

Ein direkter Vergleich zwischen Oberflächenkühlung und endovaskulärer Kühlung wurde bei Schlaganfallpatienten im Rahmen einer kleinen Studie untersucht und zeigte eine signifikant schnellere Kühleinleitung bei Verwendung von endovaskulären Kühlkathetern. Jedoch wurde in dieser Studie die Oberflächenkühlung (n=10) und die endovaskuläre Kühlung (n=7) an unterschiedlichen Zentren durchgeführt.⁵⁹ Bei Patienten mit Herz-Kreislaufstillstand konnte in zwei großen retrospektiven Untersuchungen keine Superiorität einer der beiden Methoden bezüglich der Zeit bis zum Erreichen der Zieltemperatur gezeigt werden (170 vs. 188min⁶¹ und 312 vs. 366min⁶²). Ebenso zeigte sich kein Unterschied im neurologischen Outcome der Patienten.^{61,62}

Um die Geschwindigkeit der Kühleinleitung zu erhöhen, wurde bei Patienten mit Herz-Kreislaufstillstand die i.v. Gabe großer Flüssigkeitsvolumina mit Erfolg eingesetzt.^{63,64}

Auch bei Schlaganfallpatienten konnte in einer Fallserie durch die rasche Infusion von kalter physiologischer Kochsalzlösung die im Ohr gemessene Temperatur um durchschnittlich 1,6°C in 52 Minuten gesenkt werden.⁴⁷ Allerdings klingt die Kühlwirkung von kalten Infusionen sehr rasch ab und verlangt deshalb eine Kombination mit anderen Methoden zur Aufrechterhaltung der Kühlbehandlung.⁶⁵ Eine solche Kombination von kalten i.v. Infusionen und Oberflächenkühlung oder endovaskulärer Kühlung wurde in mehreren kleineren Studien an Patienten mit akuter Hirnschädigung (unter anderem auch Schlaganfällen) als sicher und effizient beurteilt.^{58,59,66} Neuere, bisher unveröffentlichte Ergebnisse zeigten jedoch deutliche Blutdruckanstiege während der Applikation von kalten i.v. Infusionen, die an der Sicherheit der Intervention zweifeln lassen (S. Poli, persönliche Mitteilung). Zwei aktuell rekrutierende Multicenterstudien, die eine Anwendung von Hypothermie bei akutem Schlaganfall untersuchen, EuroHYP-1⁶⁷ und ICTUS 2/3⁶⁸, haben dennoch kalte i.v. Infusionen in ihr Studienprotokoll integriert.

1.5. Selektive Hirnkühlung

Experimentelle Studien geben klare Hinweise darauf, dass die protektiven Effekte von Hypothermie auf Ischämie/Reperfusionsschäden nicht auf das Gehirn beschränkt sind sondern in verschiedenen Organsystemen auftreten.⁶⁹⁻⁷¹ Es scheint deshalb naheliegend, dass Ganzkörperkühlung in Situationen in denen der gesamte Körper von der Ischämie betroffen ist - wie zum Beispiel bei Herz-Kreislaufstillstand - von Vorteil sein könnte. Hingegen werden die neuroprotektiven Effekte von Hypothermie durch die lokale Temperaturreduktion im Gehirn ausgelöst und sind von der Körperkerntemperatur unabhängig.³⁷ Beim ischämischen Schlaganfall, bei dem es zu isolierter cerebraler Ischämie kommt, könnte also möglicherweise auf eine Ganzkörperkühlung zu Gunsten einer selektiven Hirnkühlung verzichtet werden ohne die neuroprotektive Wirksamkeit zu beeinflussen. Durch eine solche Fokussierung der Kühlbehandlung ergeben sich mehrere Vorteile: Da die Kühltherapie auf ein wesentlich kleineres Gewebvolumen angewendet wird, müssten theoretisch wesentlich höhere Kühlraten erreicht werden können. Zudem wird die Körperkerntemperatur bei der selektiven Kühlung nur marginal reduziert. Dies könnte idealerweise dabei helfen das Auftreten von systemischen Nebenwirkungen (siehe Abschnitt 1.4.2) auch bei lokal tiefen

Hirntemperaturen zu limitieren. Zu welchem Ausmaß das Auftreten von systemischen Nebenwirkungen verhindert werden kann ist derzeit allerdings noch unklar.⁷²

1.5.1. Methoden der selektiven Hirnkühlung

Um selektive Hirnkühlung zu induzieren wurde eine Reihe von neuen Kühlmethoden getestet: Kühlhelme, nasopharyngeale Kühlung, Kühlspulen, intraventrikuläre Kühlkatheter, Liquoraustausch und intra-arterielle kalte Infusionen in die hirnversorgenden Gefäße.

Kühlhelme zeigten in klinischen Studien nur mäßigen Einfluss auf die Hirntemperatur. Passive Kühlhelme, die vor Anwendung in Kühlschränken gelagert werden und sich bei Anwendung auf der Haut langsam erwärmen, zeigten keine⁷³ oder nur minimale Effekte ($-0,36^{\circ}\text{C}$)⁷⁴ auf die tiefe Hirntemperatur. Für aktive Kühlhelme, die kontinuierlich von kalter Flüssigkeit durchflossen werden, konnten wesentlich stärkere Effekte auf die oberflächliche Hirntemperatur gezeigt werden ($-1,84^{\circ}\text{C}$)⁷⁵. Allerdings legen die Ergebnisse von theoretischen Analysen nahe, dass diese oberflächliche Kühlwirkung in tieferen Hirnregionen rasch durch den hohen Blutfluss ausgeglichen wird.⁷⁶⁻⁷⁸

Nasopharyngeale Methoden versuchen durch lokale Kühlung des dichten Gefäßbettes im Nasen- und Rachenraum, der sich in enger räumlicher Nähe zum Gehirn befindet, die Hirntemperatur zu senken. Die durch nasopharyngeale Methoden erreichten Kühleffekte waren in Studien stark von der gewählten Kühltechnik abhängig: Die Beatmung von Patienten mit kalter Luft führte zu keiner klinisch relevanten Kühlwirkung auf das Gehirn.^{73,79,80} Zwei Studien untersuchten Ballonkatheter, die in den Nasopharynx eingebracht werden und von einer kalten Flüssigkeit durchflossen sind. Hier zeigte die non-invasive Messung der Hirntemperatur mittels Magnetresonanz-Spektroskopie eine relevante Reduktion der Hirntemperatur von gesunden Probanden um $1,7^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 60 Minuten.⁸¹ Bei direkter Messung der Hirntemperatur an Patienten mit Hirnschädigung zeigte sich hingegen kein oder nur ein stark verzögertes Ansprechen auf die Kühlbehandlung, das insgesamt als insuffizient eingestuft wurde.⁸² Nasopharyngeale Applikation eines inerten, volatilen Kühlmittels mit dem RhinoChill® Gerät führte in zwei Studien zu einer Reduktion der Hirntemperatur um $1,2\text{--}1,4^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 60 Minuten.^{83,84} Allerdings wurden bei der Anwendung potentiell gefährliche Blutdruckanstiege beobachtet.⁸⁵

Stärkere temperatursenkende Effekte zeigten mehrere invasive Methoden zur selektiven Hirnkühlung, die in Tierexperimenten oder kleinen Fallserien untersucht wurden. In einem Rattenmodell konnte durch die Platzierung von Kühlpulen unter den Temporalmuskel erfolgreich eine selektive Kühlung des Gehirns induziert und Temperatur im ipsilateralen Cortex innerhalb von 10 Minuten auf unter 34°C reduziert werden.^{86,87} Bei Schafen konnte durch die intraventrikuläre Platzierung eines Kühlkatheters die Hirntemperatur innerhalb von 15 Minuten auf 34.5°C gesenkt werden.⁸⁸ In einer kleinen Fallserie wurde versucht bei 4 Schlaganfallpatienten den Liquor cerebrospinalis durch eine artifizielle oxygenierte Nährlösung mit Zimmertemperatur zu ersetzen. Eine Messung der Hirntemperatur wurde in dieser Studie allerdings nicht durchgeführt.⁸⁹ Trotz dieser teils eindrucksvollen Resultate, wird eine zukünftige Anwendung dieser Methoden durch deren hohe Invasivität stark eingeschränkt bleiben.

1.5.2. Intra-arterielle kalte Infusionen

Die dichte Vaskularisierung des Gehirns spiegelt dessen hohe metabolische Aktivität wider. In Ruhe wird das Gehirn von 15% des Herzzeitvolumens durchflossen und trägt einen Anteil von 20-25% des Gesamtmetabolismus. Der ungewöhnlich hohe Blutfluss sorgt auch für eine hocheffiziente Ableitung von Wärme und hält die Hirntemperatur stabil. Dieser Mechanismus stellt für die meisten selektiven Hirnkühlungsmethoden ein Problem dar, da der Zufluss von warmem Blut aus dem Körperkern den Kühlmaßnahmen kontinuierlich entgegenwirkt. Kalte intra-arterielle Infusionen (AI) hingegen nutzen den Blutfluss um mit Hilfe eines kühlen Blut/Infusions-Gemisches selektive Hypothermie im Gehirn zu erzeugen. Besonders naheliegend wäre die Anwendung von intra-arteriellen kalten Infusionen im Rahmen von endovaskulären Rekanalisationsversuchen, die unter besonderen Voraussetzungen bei Patienten mit akuten proximalen Gefäßverschlüssen durchgeführt werden.⁹⁰ Während dieser angiographischen Eingriffe könnte kalte Flüssigkeit nach erfolgreicher Rekanalisation einfach über den vorhandenen endovaskulären Katheter infundiert werden.

Während selektive Hypothermie durch kalte Infusionen schon seit Jahren im Rahmen von neurochirurgischen^{91,92} und herzchirurgischen Eingriffen⁹³⁻⁹⁵ verwendet wurde, ist das Konzept einer Anwendung bei Schlaganfallpatienten relativ neu. In Folge werden

deshalb zuerst die verfügbaren Daten aus Computersimulationen und einer Pilotstudie an gesunden Probanden zusammengefasst, bevor auf die derzeitige, ausschließlich auf Tierexperimenten beruhende Datenlage eingegangen wird.

1.5.2.1. Computersimulationen beim akutem Schlaganfall

Mögliche Auswirkungen von kalten AI auf die Hirntemperatur während akuter Schlaganfälle wurde mehrfach mit Hilfe von Computermodellen simuliert.⁹⁶⁻¹⁰¹

Die Simulationen von Slotbloom et al. basieren auf der Idee den okkludierenden Thrombus vor der Entfernung mit einem Katheter zu durchdringen und kalte Flüssigkeit in das ischämische Areal distal des Verschlusses zu infundieren (Prä-Reperfusion). Die Autoren argumentieren, dass es ihrer Erfahrung nach häufig im Rahmen von Rekanalisationsversuchen zu einem solchen Durchdringen des Thrombus kommt bevor eine Rekanalisation erreicht wird, und ein solches Vorgehen somit leicht klinisch umsetzbar wäre. Nach ihren Berechnungen könnte durch Infusion einer 15°C kalten Lösung mit 15ml/min ein Hirnvolumen von 300g innerhalb von weniger als 6 Minuten auf eine Temperatur von 34°C gekühlt werden.^{100,102}

Eine andere Herangehensweise wird von Konstas et. al. vorgeschlagen. Diese Gruppe verwendete ein Computermodell eines Gehirns mit einer fokalen Ischämiezone, in der zwischen einem Infarktkern und einer Penumbra unterschieden wird. Die Infusion kalter Flüssigkeit erfolgte in diesem Modell in die A. carotis interna, also proximal des okkludierenden Thrombus. Auch bei dieser Vorgehensweise wird prognostiziert, dass die Infusion eines moderaten Flüssigkeitsbolus von 150ml über 5 Minuten (30ml/min) ausreicht um die Hirntemperatur in der Penumbra auf 34°C zu senken.⁹⁶ Würde eine solche Infusion für 60 Minuten aufrecht erhalten (Gesamtvolumen: 1,8 Liter), käme es zu einem Absinken der Temperatur im ischämischen Gebiet auf 32°C. Eine noch intensivere Temperatursenkung (<29°C) wäre durch eine Steigerung der Infusionsrate auf 50ml/min (Gesamtvolumen: 3 Liter) möglich.⁹⁶ Laut den Ergebnissen dieser Computersimulation wären die Effekte der erreichten Hirnkühlung hochselektiv. Abhängig von der Infusionsrate wird ein Absinken der Körperkerntemperatur um lediglich 1°C (30ml/kg)⁹⁷ oder 1.8°C (50ml/kg)⁹⁶ vorhergesagt. Diese Prognose entspricht relativ genau den Ergebnissen einer bereits genannten klinischen Studie, in der die i.v. Infusion eines ähnlichen Volumens (2,2 Liter) die Körperkerntemperatur

von Schlaganfallpatienten innerhalb von 52 Minuten um 1,6°C reduzierte.⁴⁷ Zusammenfassend prognostizieren beide Computersimulationen übereinstimmend, dass durch intra-arterielle kalte Infusionen eine 10-30 Mal schnellere Hirnkühlung erreicht werden kann als durch etablierte Ganzkörperkühlverfahren.^{96,100} Sogar im Vergleich zu i.v. kalten Infusionen, der derzeit schnellsten Methode zur Kühleinleitung, könnten in der vom Schlaganfall betroffenen Hemisphäre 4-5 Mal höhere Kühlraten möglich sein.⁹⁶

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass beide Forschungsgruppen annahmen, dass zur Applikation der kalten Infusionslösungen ein wärmeisolierter Katheter verwendet wird.^{96,100} Dies entspricht nicht dem derzeitigen Vorgehen während endovaskulärer Rekanalisationsversuche, bei denen routinemäßig nicht-isolierte Katheter zur Anwendung kommen. Die Wärmeleiteigenschaften des Katheters sind von besonderer Bedeutung für den lokalen Kühleffekt von kalten Infusionen, da die Infusionslösung während des Transports durch den Katheter dem Wärmetransfer durch das umgebende 37°C warme Blut ausgesetzt ist. Falls dafür gängige endovaskuläre Katheter verwendet werden, muss also damit gerechnet werden, dass die lokalen Kühleffekte geringer ausfallen werden als in diesen Modellberechnungen vorgesehen.

1.5.2.2. Anwendbarkeit beim Menschen

Auf Grundlage der eben dargestellten Computersimulationen untersuchte eine klinische Pilotstudie die Machbarkeit und Sicherheit von AI zur selektiven Hirnkühlung an 18 wachen Versuchspersonen. Die Studie wurde an Patienten durchgeführt, die nach stattgehabter, erfolgreicher Versorgung einer vaskulären Malformation einer elektiven Kontrolluntersuchung unterzogen wurden. Am Ende der Untersuchung wurde ein Volumen von 330ml kalter physiologischer Kochsalzlösung (4-17°C) über 10 Minuten (33mL/min) in die A. carotis interna infundiert. Dafür wurden (anders als bei den zuvor beschriebenen Computermodellen) nicht-isolierte Routinekatheter verwendet. Da eine invasive Messung der Hirntemperatur an den Studienteilnehmern nicht durchgeführt werden konnte, wurde die Temperatur im Bulbus superior venae jugularis internae (BVJT) als Surrogatparameter verwendet. Die kalte Infusion führte zu einer kontinuierlichen Reduktion der BJVT über die gesamte Infusionsdauer und erreichte

nach 10 Minuten mit $-0,84^{\circ}\text{C}$ ein Maximum. Signifikante Änderungen der Vitalparameter, Zeichen von Vasospasmen oder neurologische Symptome wurden an den Probanden nicht beobachtet. Lediglich leichtes Kältezittern, das als nicht unangenehm bewertet wurde, konnte bei 3 von 18 Probanden festgestellt werden.¹⁰³

Die Verwendung der BJVT als Surrogatparameter stellt eine wesentliche Limitation dieser Studie dar, da diese in anderen Untersuchungen wesentlich besser mit der Körperkern- als mit der Hirntemperatur korrelierte.¹⁰⁴ Um dennoch eine Abschätzung der Hirntemperatur zu ermöglichen, wurde das in Abschnitt 1.5.2.1 beschriebene Modell von Konstas et al. verwendet um aufgrund der gemessenen Parameter die Hirntemperatur zu berechnen. Die Ergebnisse lassen trotz der Verwendung von nicht-isolierten Routinekathetern auf eine Temperaturreduktion von $1,9\text{-}2,1^{\circ}\text{C}$ innerhalb der 10-minütigen Infusionsdauer schließen.¹⁰¹

1.5.3. Tierexperimentelle Daten zu AI bei akutem Schlaganfall

Die in den Abschnitten 1.5.2.1 und 1.5.2.2 beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwendung von kalten AI beim Menschen zu einer effizienten und selektiven Hirnkühlung führen könnte. Hinweise auf mögliche neuroprotektive Effekte einer solchen Behandlung basieren derzeit allerdings nur auf tierexperimentellen Studien an Ratten. Hier wurden bislang zwei Arten von intra-arteriellen Infusionen auf ihre Wirksamkeit beim akuten Schlaganfall untersucht: (1) AI mit hohen Flussraten und relativ hohen Infusionstemperaturen wurden verwendet um vor Reperfusion das ischämische Gewebe von Metaboliten und vasoaktiven Substanzen zu reinigen und so Reperfusionsschäden zu vermindern (*Pre-reperfusion flushing*).¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ (2) Intra-arterielle Applikation ähnlicher Flüssigkeitsvolumina mit niedrigeren Flussraten und tiefen Infusionstemperaturen wurden verwendet um selektive Hypothermie im Hirnparenchym zu erzeugen.¹⁰⁹⁻¹¹⁶

1.5.3.1. *Pre-reperfusion Flushing*

Das Konzept von *Pre-reperfusion Flushing* wurde erstmals 2002 von Ding et. al. präsentiert: In einem Rattenmodell wurde die A. cerebri media für 2 Stunden mit Hilfe eines Filaments verschlossen. Dieses Filament verfügte über ein Lumen, durch das

physiologische Kochsalzlösung infundiert wurde, bevor durch Zurückziehen des Filaments der Blutfluss wiederhergestellt wurde (Prä-Reperfusion). Die Infusion von 7ml Flüssigkeit mit einer Flussrate von 2ml/min reduzierte das Infarktvolumen signifikant und verbesserte das funktionelle Outcome der Versuchstiere nach 48 Stunden¹⁰⁵ und 28 Tagen¹⁰⁶. Dabei hatte es keine signifikante Auswirkung auf diese Endpunkte ob eine Infusionstemperatur von 37°C oder 24°C gewählt wurde.¹⁰⁵ Dies wurde darauf zurückgeführt, dass durch die kurze Infusionsdauer (3-4 Minuten) die Infusion von 24°C kalter Flüssigkeit zwar zu einem starken Abfall der kortikalen Hirntemperatur von 37,5°C auf 32,4°C führte, diese sich aber bereits 2 Minuten nach Infusionsende wieder normalisierte.¹⁰⁶

1.5.3.2. Kalte intra-arterielle Infusionen

Zur tierexperimentellen Untersuchung der Auswirkung von kalten AI beim akuten Schlaganfall kamen zwei unterschiedliche Infusionsregime zur Anwendung: In der Mehrzahl der Experimente wurde das zuvor beschriebene Filamentmodell von Ding et al. verwendet um vor Einsetzen der Reperfusion Hypothermie zu induzieren (Prä-Reperfusion AI). Anders als bei dem im Abschnitt 1.5.3.1 besprochenen *Pre-reperfusion Flushing* kamen in diesen Experimenten kältere Infusionslösungen (0-20°C) zum Einsatz, die über einen Zeitraum von 10 Minuten langsam infundiert wurden (0,6ml/min).^{109,113-115} Kalte Prä-Reperfusion AI mit einer Temperatur von 20°C senkten in allen Experimenten die ipsilaterale Hirntemperatur innerhalb von 5-10 Minuten auf 32-34°C.^{109,113-115} Eine Reduktion der Infusionstemperatur auf 0°C führte zu einer Verstärkung dieses Effektes und einer Temperaturreduktion auf unter 31°C in Cortex und Striatum in weniger als 3 Minuten.¹¹² Kalte Prä-Reperfusion AI zeigte in allen Experimenten eine signifikante neuroprotektive Wirkung und reduzierte Infarktvolumina um 30¹¹² bis 90%¹¹⁵. Ebenso kam es zu einer Verbesserung des funktionellen Outcomes nach 48 Stunden^{109,111,112} und 28 Tagen^{113,115}.

Die Anwendung von AI nach Wiederherstellung der Blutversorgung (Post-Reperfusion AI) wurde in zwei Studien von Ji et al. untersucht. In diesen Experimenten wurde nach Wiederherstellung des Blutflusses im ischämischen Areal ein Katheter in die A. carotis interna eingebracht und kalte Flüssigkeit infundiert.^{110,116} In einer ersten Studie kam dabei ein Infusionsvolumen von 7.5 mL physiologischer Kochsalzlösung (10°C) zum

Einsatz, das entweder kontinuierlich über 30 Minuten (1x30min) oder fraktioniert über 3x10 Minuten, gefolgt von einer 20-minütigen Pause infundiert wurde (3x 10min+20min Pause). Die Infusionsrate wurde in beiden Gruppen konstant bei 0.25 mL/min gehalten.¹¹⁰ In einer zweiten Studie erfolgte eine 20-minütige Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (10°C), bei der die Flussrate kontinuierlich in einem Bereich zwischen 0.16-0.42 ml/min angepasst wurde um die Hirntemperatur zwischen 33-34°C zu stabilisieren.¹¹⁶ Verglichen mit den sehr hohen Induktionsgeschwindigkeiten die für kalte Prä-Reperfusion AI berichtet wurden (<10 min), benötigten kalte Post-Reperfusion AI wesentlich länger um hypotherme Hirntemperaturen zu erreichen: Bei einer Infusionsrate von 0,25 mL/min und einer Infusionstemperatur von 10°C wurden 20 Minuten benötigt um die Temperatur im Hirnparenchym auf unter 35°C zu senken.¹¹⁰ Die geringere Kühlrate kann dadurch erklärt werden, dass sich nach Einsetzen der Reperfusion die kalte Infusionslösung mit warmem Blut vermischt sobald sie in die Blutgefäße eintritt. Das resultierende Blut/Infusionsgemisch ist somit wärmer als die initiale Infusionslösung und zeigt eine wesentlich kleinere Kühlwirkung. Zudem war die Infusionsrate in den beschriebenen Post-Reperfusion AI Experimenten um ca. 50% geringer als in den Prä-Reperfusion AI Experimenten (0,15-0,42ml/min vs. 0,6ml/min).

Trotz der langsameren Kühllinduktion zeigte sich in allen Post-Reperfusion Experimenten eine signifikante Verkleinerung der Infarkt volumina.^{110,116} Diese war besonders ausgeprägt wenn die Infusion unmittelbar nach Einsetzen der Reperfusion gestartet wurde, konnte aber auch bei einem Infusionsbeginn bis zu 2 Stunden nach Wiederherstellung der Blutversorgung noch nachgewiesen werden.¹¹⁶ Das funktionelle Outcome wurde nur in einer der beiden Studien positiv beeinflusst.¹¹⁶ Allerdings wurde in der diesbezüglich negativen Studie eine relativ langsame Kühllinduktion berichtet, ein Umstand der möglicherweise den Therapieerfolg limitierte.¹¹⁰ Zudem wurde in beiden Studien nach Beendigung der kalten Infusion die Körper- und Hirntemperatur durch aktives Erwärmen rasch wieder normalisiert, was den Therapieerfolg vermutlich insgesamt beschränkte.

Anders als beim *Pre-reperfusion Flushing*, wo sich keine Temperaturabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte zeigte, führte die Reduktion der Hirntemperatur durch kalte Infusionen sowohl bei Prä- als auch in Post-Reperfusion AI in allen bisherigen

Experimenten zu einem signifikant stärkeren protektiven Effekt als die Infusion körperwarmer Lösungen (37°C).^{110-112,114-116}

1.5.3.3. Limitationen der bisherigen tierexperimentellen Datenlage

Intra-arterielle Infusionen zeigten in allen bisherigen tierexperimentellen Anwendungen bei akutem Schlaganfall eine deutliche neuroprotektive Wirkung. Die Mehrzahl der Experimente konzentrierte sich auf eine Anwendung der Infusionen vor Wiederherstellung der Blutzirkulation im ischämischen Territorium (Prä-Reperfusion). Während ein solches Vorgehen die Reinigung des Gefäßterritoriums beim *Pre-Reperfusion Flushing* bzw. die Kühleffekte bei kalten Prä-Reperfusionen AI begünstigt, da eine Vermischung des Infusats mit Blut vermieden wird, steht es im Konflikt mit einer möglichst frühen Rekanalisation. In der klinischen Versorgung stellt eine frühe Rekanalisation den wichtigsten Faktor für ein gutes funktionelles Outcome von Schlaganfallpatienten dar.¹¹⁷ Eine bewusste Verzögerung der Reperfusion zur Durchführung der AI wäre somit schwer vorstellbar. Wesentlich attraktiver wären Post-Reperfusionen AI, ein Vorgehen das tierexperimentell bisher nicht ausreichend untersucht wurde. Die verfügbaren Ergebnisse ergaben im Vergleich zu Prä-Reperfusionen AI eine etwas geringere protektive Wirkung, basieren derzeit jedoch auf den Experimenten einer einzigen Arbeitsgruppe in denen vergleichsweise moderate Infusionsparameter gewählt wurden.^{110,116}

Der Einfluss von Infusionsparametern, insbesondere der Infusionstemperatur, auf die neuroprotektive Wirkung von AI ist ein weiterer bisher unzureichend untersuchter Faktor. Es wurde sowohl für Prä- als auch für Post-Reperfusionen AI gezeigt, dass kalte Lösungen (0-20°C) eine stärkere protektive Wirkung haben als körperwarmer Infusionen. Ob jedoch ein ähnlich wie bei der Ganzkörperkühlung temperaturabhängiger Effekt besteht, der sich möglicherweise bei niedrigeren Infusionstemperaturen verstärkt wurde bisher noch nie untersucht.

1.6. Hyperoxygenierung

Neben der therapeutischen Hypothermie gilt die Sauerstofftherapie als ein weiteres vielversprechendes Behandlungskonzept zur multimodalen Neuroprotektion bei akutem

Schlaganfall. Bei der Sauerstofftherapie wird durch den Einsatz von reinem Sauerstoff als Atemgas unter normobarem oder hyperbarem Druck (NBO bzw. HBO) eine Hyperoxygenierung des Blutes hergestellt. Anders als bei der Behandlung mit Hypothermie, bei der eine Reduktion des Zellmetabolismus und somit des zellulären Sauerstoffbedarfs angestrebt wird, ist es das primäre Ziel der Sauerstofftherapie das Sauerstoffangebot in den ischämischen Hirnarealen zu verbessern.

1.6.1. Mechanismen der Neuroprotektion durch Hyperoxygenierung

Der Sauerstoffbedarf des Gehirns ist hoch und wird in Ruhe nur von dem des Herzmuskels übertroffen.¹¹⁸ Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der Transport von Sauerstoff im Blut zum allergrößten Teil durch Bindung an Hämoglobin (ca. 18,9ml/100ml Blut). Physikalisch gelöster Sauerstoff kommt im Vergleich eine untergeordnete Rolle zu (ca. 0,3ml/100ml Blut). Da Hämoglobin bereits bei einem Sauerstoffanteil von 21% in der Atemluft fast vollständig mit Sauerstoff gesättigt ist, kommt es durch Hyperoxygenierung vorrangig zu einer Steigerung des physikalisch im Blut gelösten Sauerstoffanteils. Dieser erhöht sich durch Ventilation mit 100% Sauerstoff unter normobarem Druck (1 bar, NBO) auf 2ml/100ml Blut, und kann durch Überdruckbeatmung mit hyperbarem Druck (HBO) noch weiter gesteigert werden (ca. 5,4ml/100ml Blut bei 2,5atm).¹¹⁹ Tierexperimentelle Daten belegen, dass während fokaler cerebraler Ischämie durch NBO das Sauerstoffangebot in der Penumbra auf dem gleichen Niveau wie vor Ischämieinduktion gehalten werden konnte.¹²⁰ Durch den Einsatz von HBO kam es in der ischämischen Penumbra sogar zu einer Verbesserung des Sauerstoffangebots um 20%.¹²¹

Es scheint naheliegend, dass durch die Verbesserung des Sauerstoffangebots im ischämischen Gewebe positiver Einfluss auf wesentliche pathophysiologische Mechanismen des Schlaganfalls genommen werden kann. In der Tat zeigten tierexperimentelle Studien eine positive Wirkung auf Exzitotoxizität¹²², Inflammation¹²³ und die Stabilität der Blut/Hirn Schranke¹²⁴. Es finden sich aber auch Hinweise darauf, dass die Schutzwirkung von Hyperoxygenierung teilweise unabhängig von der verbesserten Sauerstoffversorgung in der ischämischen Phase auftritt. So konnten in Tierstudien auch bei Therapieeinleitung mehrere Stunden nach Einsetzen der Reperfusion noch neuroprotektive Effekte erzielt werden.¹²⁵ Dennoch scheint ähnlich

wie bei therapeutischer Hypothermie die Schutzwirkung von Hyperoxygenierung durch einen frühen Therapiebeginn verstärkt zu werden.¹²⁶

Obwohl protektive Effekte von Hyperoxygenierung auch bei permanenter cerebraler Ischämie gezeigt werden konnten^{124,127,128}, zeigen die Analysen mehrerer Übersichtsarbeiten dass das größte Potential von Sauerstofftherapie wahrscheinlich in der Behandlung von transienten Ischämien liegt.^{119,129,130}

Dem geringeren Einfluss auf das arterielle Sauerstoffangebot entsprechend, zeigte NBO im Vergleich zu HBO in Studien insgesamt einen kleineren neuroprotektiven Effekt und war an ein engeres therapeutisches Zeitfenster gebunden.¹¹⁹ Die klinische Umsetzung von HBO ist allerdings an das Vorhandensein einer Druckkammer gebunden und somit heute nur in sehr wenigen Zentren verfügbar. Aufgrund der ungleich höheren klinischen Praktikabilität von NBO wird dieser Methode deshalb trotz der geringeren Effektivität noch immer eine berechtigte Stellung in zukünftigen Studien zugeschrieben.^{129,130}

1.6.2. Klinische Erfahrungen mit Hyperoxygenierung bei Schlaganfall

Trotz einer großen Zahl an Fallberichten über die Behandlung von Schlaganfallpatienten mit HBO oder NBO, ist die derzeitige Evidenz aus kontrollierten klinischen Studien insuffizient.¹¹⁹ Drei kleinere klinische Studien untersuchten die Anwendung von HBO nach akuten Schlaganfällen ohne dass ein signifikanter Behandlungseffekt gezeigt werden konnte.¹³¹⁻¹³³ Allerdings wurden bei allen dieser Studien deutliche Mängel im Studienaufbau kritisiert, die die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse einschränken^{119,129}: In den Studien von Nighoghossian et al. und Rusyniak et al. wurden Patienten zumeist erst mehr als 12 Stunden nach Symptombeginn behandelt^{132,133}, ein Zeitpunkt an dem die Existenz einer großen rettbaren Penumbra unwahrscheinlich ist. In der Studie von Anderson et al. war es sogar möglich Patienten bis zu 2 Wochen nach Beginn der Schlaganfallsymptome einzuschließen. Im Durchschnitt wurde die Behandlung in dieser Studie mehr als 50 Stunden nach Symptombeginn begonnen.¹³¹ Die Behandlung der Kontrollgruppen erfolgte bei Rusyniak et al. mit NBO¹³³ und bei Anderson et al. mit hyperbarer Raumluft.¹³¹ Während durch die Wahl der Kontrollgruppe eine Beeinflussung des natürlichen Krankheitsverlaufs in letzterem Fall nicht auszuschließen ist, muss im ersten Fall damit sogar gerechnet werden. Trotz dieser methodischen Limitationen und den

kleinen Fallzahlen (n = 33-39) finden sich in den Ergebnissen dieser Studien zwei interessante Hinweise: In der Studie von Nighoghossian et al. zeigte sich nach einem Jahr ein nicht signifikanter Trend zu einem besseren funktionellen Outcome nach HBO Behandlung.¹³² Die Studie von Rusyniak, bei der HBO mit NBO verglichen wurden, zeigte für die NBO Behandlung ein signifikant besseres funktionelles Outcome nach 3 Monaten.¹³³

Zwei klinische Untersuchungen zur NBO Therapie wurden von Singhal et al. präsentiert. Hier zeigte sich bei 16 Patienten, die weniger als 12 Stunden nach Symptombeginn NBO für 8 Stunden erhielten, eine signifikant verzögerte Ausbreitung der diffusionsgestörten Areale in der MR Bildgebung während der Behandlung. Bei einigen Patienten konnte während der Behandlung sogar unabhängig vom Auftreten von Reperfusion eine Reduktion der diffusionsgestörten Areale beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine erfolgreiche Stabilisierung der Penumbra hin. Zudem bestanden nach 24 Stunden signifikant weniger neurologische Defizite (quantifiziert anhand der NIH Stroke Scale), ein Effekt der als nicht-signifikanter Trend bis zu 3 Monate nach Behandlung nachzuweisen war.¹³⁴ In einer zweiten Auswertung die größtenteils auf dem gleichen Patientenkollektiv beruht konnte gezeigt werden, dass NBO zu einer Verbesserung des zellulären Metabolismus und zu niedrigeren Laktatspiegeln in der Penumbra führt.¹³⁵ Eine Untersuchung von Padma et al. untersuchte an 20 Schlaganfallpatienten mit einem Zeitfenster <12 Stunden eine 12-stündige Behandlung mit 10 Litern Sauerstoff pro Minute, ohne dass ein Unterschied im funktionellen Outcome festgestellt werden konnte.¹³⁶ Hier muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die gewählte Flussrate im Vergleich zu anderen NBO-Studien relativ gering war und möglicherweise keine suffiziente Hyperoxygenierung des Blutes herbeiführte.

Eine größere klinische Untersuchung zur Neuroprotektion von NBO beim akuten Schlaganfall [NCT00414726] wurde nach Einschluss von 85/240 Patienten abgebrochen. Es kam dabei zu Sicherheitsbedenken, als in einer Zwischenanalyse eine signifikant höhere Mortalität in der Therapiegruppe festgestellt wurde. In einer verblindeten retrospektiven Analyse konnte dieser Verdacht widerlegt werden. Es zeigte sich, dass die beobachteten Todesfälle nicht durch die Studienintervention bedingt

waren, sondern durch die schwereren Infarkte und Vorerkrankungen der in die Therapiegruppe randomisierten Patienten verursacht wurden.¹³⁷

1.6.3. Nebenwirkungen von Hyperoxygenierung

Immer wieder wurden Sicherheitsbedenken darüber geäußert, dass die Anwendung von Hyperoxygenierung zu einer erhöhten Bildung von potentiell schädlichen Sauerstoffradikalen führen könnte. Durch Ischämie und Reperfusion kommt es bereits ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr zu einer gesteigerten Produktion von Sauerstoffradikalen im Hirnparenchym. Ursächlich hierfür sind Störungen im zellulären Energiemetabolismus und eine Erschöpfung der antioxidativen Schutzmechanismen. Sauerstoffradikale führen zu oxidativen Schäden an wichtigen Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren und können so Zelltod auslösen.¹³⁸ Ob dieser Prozess durch Hyperoxygenierung in einer relevanten Weise verstärkt wird ist derzeit nicht abschließend geklärt.¹³⁰ So deuten beispielsweise die Ergebnisse einer Tierstudie darauf hin, dass es durch HBO Therapie zwar zu einer erhöhten Bildung von Sauerstoffradikalen kommt, dies aber nicht zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation führt, was eine Erhöhung des oxidativen Zellschadens unwahrscheinlich macht.¹³⁹ Experimentelle Daten aus einem Tiermodell transientser Ischämie deuten zudem darauf hin, dass sich die durch NBO erzeugte Neuroprotektion steigert, wenn eine während der Ischämiephase begonnene NBO Behandlung nach Einsetzen der Reperfusion fortgeführt wird.¹⁴⁰ Auch wenn die NBO Therapie erst in der Reperfusionphase begonnen wurde führte dies in begrenztem Ausmaß zu Neuroprotektion.¹⁴⁰ Diese Resultate sprechen gegen eine relevante Verstärkung des Reperfusionsschadens durch NBO.

Ein weiterer potentiell schädlicher Effekt ist die Vasokonstriktion die durch Hyperoxygenierung im Gehirn ausgelöst wird und theoretisch zu einer Verschlechterung der ischämischen Verhältnisse führen könnte.¹¹⁹ Ursächlich dafür ist wahrscheinlich eine Störung der NO-induzierten Vasodilatation.¹⁴¹ Es ist jedoch unklar ob dieser Effekt, der im nicht-ischämischen Gehirn sowohl bei Menschen¹⁴² als auch bei Versuchstieren^{141,143} während Sauerstofftherapie beobachtet wurde, in gleicher Weise im ischämischen Hirngewebe zum Tragen kommt. Im ischämischen Gewebe kommt es zu einer schweren Dysfunktion der vasoregulatorischen Mechanismen, wodurch eine

effektive Vasokonstriktion verhindert wird. In Kombination mit der durch Hyperoxygenierung erzeugten Vasokonstriktion im gesunden Hirngewebe könnte dies zu einer Umverteilung des Blutflusses zu Gunsten der ischämischen Areale führen, ein Phänomen das als „inverse steal“ bezeichnet wird.¹⁴⁴ Diese These wird durch bildgebende Untersuchungen während NBO Therapie an Schlaganfallpatienten¹³⁴ und Versuchstieren¹²⁶ gestützt, die keine Verminderung sondern eine Erhöhung des totalen Blutvolumens in den ischämischen Arealen zeigte.

Pulmonale Nebenwirkungen von Hyperoxygenierung wie eine Erhöhung des pulmonalen Shuntvolumens, eine Verminderung des Atemantriebs und Hyperkapnie sind vor allem bei pulmonal vorerkrankten Personen von Relevanz.¹³⁰ Kardiale Nebenwirkungen von Hyperoxygenierung wie Bradykardie und eine Verminderung des Herzzeitvolumens sind in der Regel mild und wahrscheinlich bei Schlaganfallpatienten wenig gefährlich, da sie in der Regel nicht zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks führen.¹³⁰

1.7. Kombinationstherapie mit Hypothermie und Hyperoxygenierung

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargestellt wurde, konnte sowohl für Hypothermie als auch für Hyperoxygenierung tierexperimentell Neuroprotektion gezeigt werden. Eine Kombination dieser beiden Behandlungsstrategien erscheint aus mehreren Gründen sinnvoll. Essentiell für die neuroprotektiven Eigenschaften beider Therapieformen ist deren Einfluss auf den zellulären Metabolismus: Hypothermie reduziert den Sauerstoffbedarf und erhöht so die Toleranz für ischämisch/hypoxische Bedingungen. Hyperoxygenierung hingegen erhöht das Sauerstoffangebot in den ischämischen Bereichen und schützt so das neuronale Gewebe vor Hypoxie. Eine Kombination beider Therapien könnte hier zu synergistischen Effekten führen, da es zu einem Zusammentreffen von einem verminderten zellulären Sauerstoffbedarf mit einem erhöhten Sauerstoffangebot kommen würde. Darüber hinaus erhöht sich die physikalische Sauerstofflöslichkeit von Blut bei reduzierter Temperatur. Die durch NBO oder HBO erreichte Hyperoxygenierung des Blutes könnte deshalb bei hypothermen Körpertemperaturen weiter verstärkt werden.¹⁴⁵

Pathophysiologische Überlegungen liefern zudem Hinweise darauf, dass möglicherweise wesentliche Probleme der therapeutischen Hypothermie durch eine

Kombination mit früher Hyperoxygenierung kompensiert werden. Einerseits könnten die stabilisierenden Effekte der Hyperoxygenierung auf die Penumbra dabei helfen rettbares Gewebe zu erhalten bis eine suffiziente Absenkung der Körpertemperatur möglich ist.¹²⁷ Im Fall von Kältezittern würde der erhöhte muskuläre Sauerstoffbedarf durch Hyperoxygenierung zumindest teilweise gedeckt werden, ohne dass es zu einer Verstärkung der hypoxischen Bedingungen in der Penumbra kommt. Auch könnte die durch Hyperoxygenierung erreichte Protektion der Blut-Hirn Schranke dazu beitragen potentiell gefährliche Hirndruckanstiege zu vermeiden, die in der Wiedererwärmungsphase nach einer therapeutischer Hypothermie auftreten können.¹⁴⁶ Eine besonders attraktive Kombination ist die Anwendung von Hyperoxygenierung und Hypothermie bei Verwendung von AI. Wie in Abschnitt 1.5.2 dargestellt, wäre die klinische Anwendung von AI insbesondere während endovaskulärer Rekanalisationsversuche denkbar. Hierbei kommt es in den meisten Fällen zu einer erfolgreichen Rekanalisation und somit Wiederherstellung der Blutversorgung im ischämischen Gewebe – ein Umstand der die Schutzwirkung von Hyperoxygenierung verstärkt.¹²⁹ Es könnten somit sowohl die neuroprotektiven Wirkung von Hyperoxygenierung in der ischämischen Phase als auch die inhibierenden Effekte der Hypothermie auf die Ausbildung von Reperfusionsschäden optimal genutzt werden.^{38,127}

2. Material und Methoden

2.1. Tierexperimentelle Versuche

Alle Experimente wurden entsprechend einem durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigten Versuchsprotokoll (N3/13) durchgeführt. Männliche Sprague Dawley Ratte mit einem Gewicht zwischen 320 und 375 Gramm wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Haltung erfolgte unter Standardbedingungen in Standard-Laborkäfigen Typ IV mit einer maximalen Anzahl von 4 Tieren pro Käfig mit freiem Zugang zu Wasser und Futter im Forschungsverfügungsgebäude der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

2.2. Versuchsgruppen

Das Experiment untersuchte die neuroprotektiven Effekte von intra-arteriellen Infusionen (9ml/30min) mit drei verschiedenen Temperaturen (4°C, 23°C, 37°C) bei Beatmung mit Raumluft und in Kombination mit normobarer Hyperoxygenierung in einem tierexperimentellen MCAO-Schlaganfallmodell an Ratten mit einer Ischämiedauer von 100 Minuten. Es wurde eine Gruppengröße von 6 Tieren pro Versuchsgruppe angestrebt.

Zur selektiven Testung beider Einflussgrößen (AI; Hyperoxygenierung) wurden 8 Versuchsgruppen gebildet (siehe Abbildung 1):

- G1 100 min Ischämie, Raumluft, keine Infusion (Kontrollgruppe)
- G2 100 min Ischämie, Raumluft, Infusionstemperatur 4°C
- G3 100 min Ischämie, Raumluft, Infusionstemperatur 23°C
- G4 100 min Ischämie, Raumluft, Infusionstemperatur 37°C
- G5 100 min Ischämie, 100% Sauerstoff, keine Infusion (Kontrollgruppe NBO)
- G6 100 min Ischämie, 100% Sauerstoff, Infusionstemperatur 4°C
- G7 100 min Ischämie, 100% Sauerstoff, Infusionstemperatur 23°C
- G8 100 min Ischämie, 100% Sauerstoff, Infusionstemperatur 37°C

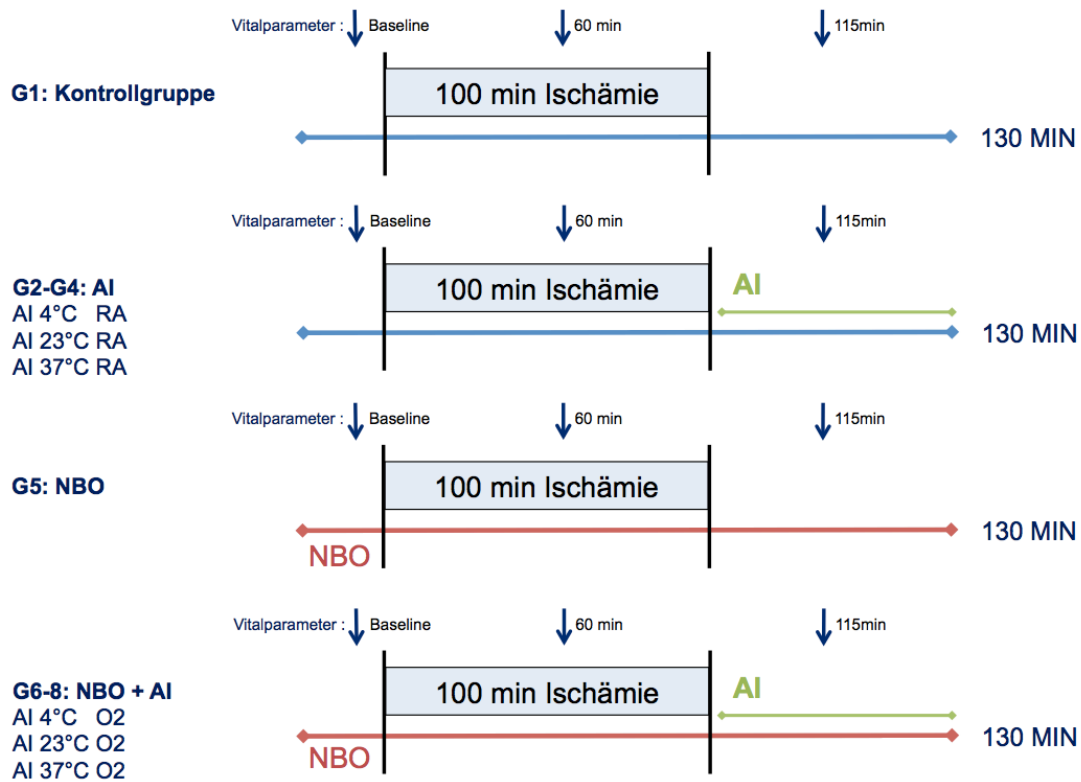


Abb. 1: Versuchsaufbau in den 8 Versuchsgruppen. In der Kontrollgruppe G1 erfolgte MCAO mit einer Dauer von 100 Minuten ohne neuroprotektive Intervention. In den Gruppen G2-4 wurde der Effekt von intra-arteriellen Infusionen (9ml/30min) mit 3 verschiedenen Temperaturen (4°C, 23°C, 37°C) untersucht. In Gruppe G5 erfolgte eine Monotherapie mit NBO. In den Gruppen G6-8 wurde eine kombinierte Therapie mit AI und NBO getestet. Eine Messung von Blutdruck und Herzfrequenz sowie arterielle Blutgasanalysen wurden jeweils vor Ischämieinduktion, nach einer Ischämiezeit von 60 Minuten und 15 Minuten nach Reperfusion durchgeführt.

2.3. MCAO Modell an der Ratte

Vor Beginn des operativen Eingriffes erfolgte die Narkoseinduktion in einer mit Isofluran (5%) und Raumluft (21% Sauerstoff und 79% Stickstoff) gefüllten Induktionskammer. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde je nach Gruppenzuteilung 1,5-2,5% Isofluran mit einem Gemisch aus 21% Sauerstoff und 79% Stickstoff (Gruppen G1-4) oder 100% Sauerstoff eingesetzt (Gruppen G5-8). Die Körperkerntemperatur während der Eingriffe wurde mit einer rektalen Temperatursonde überwacht und mit Hilfe einer Heizmatte konstant bei 37°C gehalten.

Zur Überwachung des Blutflusses in der rechten A. cerebri media verwendeten wir eine Laser-Doppler-Flussmessung (Perimed Instruments GmbH, Rommelskirchen, Deutschland). Zum Anbringen der Messsonde erfolgte eine kleine Hautinzision rechts parietal. Nach Präparation des Schädelknochens wurde zur Positionierung der Messsonde ein Bohrloch mit einem Durchmesser von 2-3mm am rechten Os parietale gesetzt.

Eine arterielle Katheterisierung der rechten A. femoralis mit Hilfe eines PE50 Katheters wurde zur invasiven Messung des arteriellen Blutdrucks sowie von pH, arteriellen Blutgasen (PaO₂, PaCO₂, SpO₂), Blutelektrolyten (Na, K), der Hämoglobinkonzentration (Hb) und des Hämatokrit (Hkt) durchgeführt. Die Messung der genannten Parameter erfolgt mit Hilfe des iSTAT® Point-of-Care Messsystems (Abbott Point of Care Inc, Chicago, USA).

Zur Aufzeichnung der rektalen Körpertemperatur (T_{rect}), der LDF Messwerte und des arteriellen Blutdrucks verwendeten wir das PowerLab® Datenaufzeichnungssystem in Verbindung mit der LabChart Software v8 (beides ADInstruments, Oxford, England).

Fokale cerebrale Ischämie wurde durch einen transienten Verschluss der rechten A. cerebri media (ACM) für 100 Minuten mittels eines modifizierten Filamentmodells nach Longa et al. induziert.¹⁴⁷ Hierzu wurde der Hals durch eine mediane Hautinzision eröffnet und die rechte A. carotis im Bereich ihrer Bifurkation freipräpariert. Nach Präparation der A. carotis externa wurde diese ligiert und durch eine kleine Inzision ein silikonbeschichtetes Nylonfilament über den Gefäßstumpf in die A. carotis interna eingebracht. Das Filament wurde bis zum Abgang der A. cerebri media vorgeschoben und ein erfolgreicher Verschluss des Gefäßabganges mittels Laser-Doppler-Flussmessung verifiziert (siehe Abbildung 2-A). Nach einer Ischämiedauer von 100 Minuten wurde das Filament vorsichtig wieder zurückgezogen und der Blutfluss dadurch wiederhergestellt. Die induzierte Ischämie wurde dabei als suffizient beurteilt wenn es nach Positionierung des Filaments über dem ACM Abgang zu einem anhaltenden Abfall des LDF Signals auf unter 40% des Ausgangswertes kam, und nach dem Zurückziehen des Filaments wieder ein rascher Anstieg der Messwerte festgestellt werden konnte.

In Versuchsgruppen in denen die intraarterielle Infusion von physiologischer Kochsalzlösung vorgesehen war (G2-4, G6-G8, siehe Abschnitt 2.2) wurde unmittelbar

nach Zurückziehen des Filaments ein PE-50 Katheter über den Gefäßstumpf der A. carotis externa eingebracht. Dessen Spitze wurde an der Carotisbifurkation positioniert und die Infusion gestartet (siehe Abbildung 2-B).

In allen Versuchsgruppen wurden nach 130 Minuten der arterielle Katheter und die LDF-Messsonde entfernt, ein Wundverschluss durchgeführt und die Narkose beendet. Zur postoperativen Analgesie erfolgte die subcutane Injektion von Xylocain 1% im Bereich der Operationswunden ca. 5 min vor dem Erwachen und durch eine einmalige Injektion von Buprenorphin 0,2 mg/kg subkutan in der Aufwachphase. Zur weiteren postoperativen Analgesie wurde 6 Stunden und 18 Stunden nach dem Eingriff Carprofen 5mg/kg intraperitoneal appliziert.

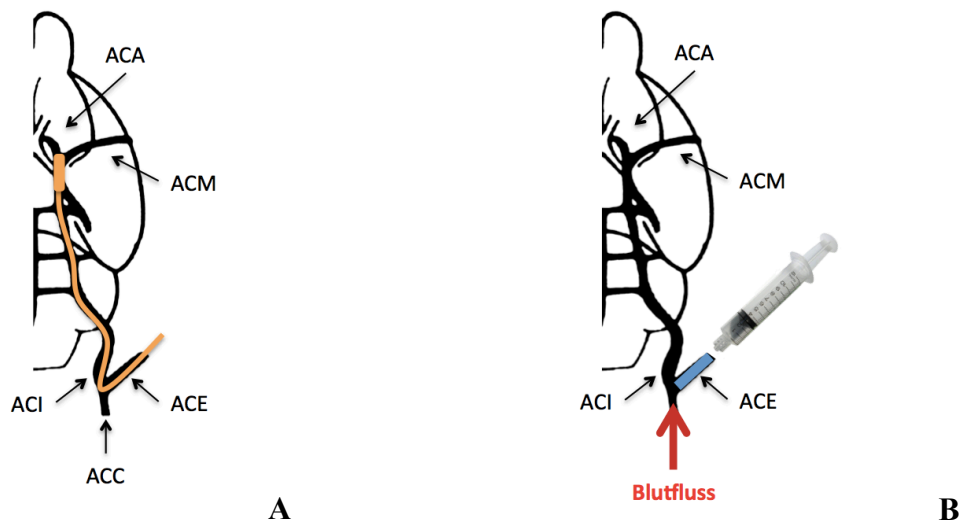


Abb. 2: Schematische Darstellung des Operationsmodells

A: Die Induktion von fokaler cerebraler Ischämie erfolgte durch den Verschluss des Abgangs der A. cerebri media.

B: Die intra-arterielle Infusion erfolgte nach Wiederherstellung der Blutversorgung durch einen an der Carotisbifurkation positionierten Katheter.

ACA: A. cerebri anterior; ACC: A. carotis communis; ACE: A. carotis externa; ACI: A. carotis interna; ACM: A. cerebri media (Grafik modifiziert nach Ding et al.¹⁰⁵)

2.4. Funktionelle Testung der Versuchstiere

Funktionelle Defizite der Versuchstiere wurden jeweils vor Durchführung der operativen Eingriffe und 24 Stunden nach Reperfusion anhand 4 standardisierter Tests durch ein für die Behandlungsgruppe verblindetes Mitglied der Arbeitsgruppe quantifiziert.

(1) Im „Forelimb Placement Test“ wird das Versuchstier an Torso umfasst und nahe einer Tischkante gehalten (siehe Abbildung 3-A). Seitengetrennt wird die Fähigkeit des Tieres beurteilt mit der Vorderpfote die Tischkante zu berühren, nachdem ein solches Verhalten durch einen ipsilateralen visuellen, taktilen oder propriozeptiven Reiz oder durch das Bestreichen der ipsilateralen Fibrissen stimuliert wurde. Die Reaktion auf jeden der 4 getesteten Stimuli wird durch ein Testwert von 0=*normales Verhalten* bis 2=*keine Reaktion auf den Stimulus* bewertet. Es ergibt sich somit ein maximaler Gesamtscore von 8 Punkten, der einer Plegie der betroffenen linken Körperhälfte entspricht.¹⁴⁸ Zur besseren Visualisierung wurden die Testergebnisse zusätzlich in eine 4-teilige Behinderungsskala überführt: 0-1=kein Defizit; 2-3=mildes Defizit; 4-6=mäßiges Defizit; 7-8=schweres Defizit.

(2) Im „Body Swing Test“ wird das Tier ca. 2,5cm distal des Schwanzansatzes gefasst und für 2-3 Sekunden vom Boden abgehoben (siehe Abbildung 3-B). Gewertet wird eine Seitwärtsbewegung des Kopfes nach links oder rechts die um mehr als 10° von der vertikalen Achse abweicht.¹⁴⁹ Nach cerebralen Ischämien kommt es aufgrund von Parese und Neglect zu einer Lateralisierungstendenz der Seitwärtsbewegung. Als Zeichen einer Lateralisierungstendenz wurde nach 30 Versuchsdurchgängen die Anzahl der von der Normalverteilung (15 rechts, 15 links) abweichenden Seitwärtsbewegungen gewertet: Absolutwert (15 – *Anzahl der Bewegungen nach rechts*). Zur besseren Visualisierung wurden die Testergebnisse zusätzlich in eine 4-teilige Behinderungsskala überführt: 0-3=kein Defizit; 4-7=mildes Defizit; 8-11=mäßiges Defizit; 12-15=schweres Defizit.

(3) Im „Corner Turn Test“ wird das Versuchstier in eine Ecke mit einem spitzen Winkel von 30° gesetzt (siehe Abbildung 3-C). Um aus der Ecke zu entkommen, kann das Versuchstier eine Wendung nach rechts oder links durchführen.¹⁴⁸ Beurteilt wurde eine mögliche Seitenpräferenz, und hierzu nach 10 Versuchsdurchgängen die Anzahl der von

der Normalverteilung (5 rechts, 5 links) abweichenden Körperwendungen gewertet: Absolutwert ($5 - \text{Anzahl der Körperwendungen nach rechts}$). Zur besseren Visualisierung wurden die Testergebnisse zusätzlich in eine 4-teilige Behinderungsskala überführt: 0-1=kein Defizit; 2=mildes Defizit; 3-4=mäßiges Defizit; 5=schweres Defizit. (4) Im „Neuroscore Test“ wurde das spontane motorische Verhalten der Versuchstiere beurteilt. Die Beurteilung erfolgte anhand einer 4-teiligen Skala: 0 = kein erkennbares Defizit; 1 = leichtes Defizit; 2 = kreisende Fortbewegung; 3 = stark kreisende Fortbewegung oder keine Spontanbewegung.¹⁵⁰



Abb. 3: Durchführung ausgewählter funktioneller Tests

A: Im „Forelimb Placement Test“ wurde die Fähigkeit des Versuchstieres beurteilt die Tischkante mit der Vorderpfote zu berühren nachdem ein solches Verhalten durch einen visuellen, taktilen oder propriozeptiven Reiz oder durch das Bestreichen der ipsilateralen Fibrissen stimuliert wurde.

B: Im „Body Swing Test“ wurde das Versuchstier für 2-3 Sekunden vom Boden abgehoben. Beurteilt wurde eine Lateralisierungstendenz der dadurch ausgelösten Seitwärtsbewegung des Kopfes nach links oder rechts.

C: Im „Corner Turn Test“ wurde das Versuchstier in eine Ecke mit einem spitzen Winkel von 30°C gesetzt. Beurteilt wurde eine mögliche Seitenpräferenz der Körperwendung nach rechts oder links, die das Versuchstier in dieser Situation instinktiv durchführt um aus der Ecke zu entkommen.

2.5. Gewichtsverlust

Alle Tiere wurden vor dem operativen Eingriff und nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden gewogen. Der Gewichtsverlust wurde aus der Differenz zwischen Ausgangsgewicht und Endgewicht berechnet. Das Ausmaß des postinterventionellen Gewichtsverlustes wird als Indikator der funktionellen Beeinträchtigung angesehen.¹⁵¹

2.6. Infarktverhalten und Ödemverhalten

Nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden wurden die Versuchstiere unter tiefer Narkose mit 5% Isofluran und Raumluft (21% Sauerstoff und 79% Stickstoff) mit 60ml physiologischer Kochsalzlösung transkardial perfundiert und danach dekapitiert. Das Gehirn wurde herauspräpariert und in 7 coronare Schnitte mit einer Dicke von 2mm geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in einer 2%igen Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) angefärbt und fotografiert. Durch die Behandlung mit TTC wird vitales, metabolisch aktives Gewebe rot gefärbt, während es in nekrotischen Bereichen die keine metabolische Aktivität aufweisen zu keiner Färbung kommt. Die Infarkt- und Ödemgröße wurden anhand der Fotografien mittels der ImageJ Bildbearbeitungssoftware (National Institute of Health, Bethesda, USA) durch ein für die Behandlungsgruppe verblindetes Mitglied der Arbeitsgruppe bestimmt. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurde das Volumen des vitalen Gewebes der ipsilateralen (rechten) Hemisphäre vom Gesamtvolumen der kontralateralen (linken) Hemisphäre abgezogen.¹²⁷ Zur Bestimmung der Ödemgröße wurde die Gesamtfläche der kontralateralen (linken) Hemisphäre von der Gesamtfläche der ipsilateralen (rechten) Hemisphäre abgezogen.

2.7. Statistische Methoden

Werte werden im Fall von kontinuierlichen Daten als *Mittelwerte ± 1 Standardabweichung* und im Fall von ordinal verteilten Daten (funktionelle Tests) als *Median (25% Perzentile, 75% Perzentile)* angegeben. Die statistische Testung kontinuierlicher Daten erfolgte durch 2-seitigen T-Test oder univariate Varianzanalyse mit Post-Hoc Vergleichen mittels Dunnet's Test. Die statistische Testung von ordinalen Daten (funktionelle Tests) erfolgte durch den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Für die statistische Testung wurde ein Signifikanzniveau von $p=0,05$ angenommen. Ergebnisse mit $p<0,001$ werden als hochsignifikant bezeichnet. Bei Mehrfachvergleichen wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni durchgeführt.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden die Daten von 108 Tieren analysiert. 7 Tieren mussten wegen einer Verletzung des Studienprotokolls und 8 Tiere wegen Komplikationen während des chirurgischen Eingriffes ausgeschlossen werden. Eine ausreichende Qualität der LDF Reduktion während der Ischämiedauer von 100 Minuten wurde in 51 der verbleibenden 92 Tiere erreicht.

Unabhängig von der Qualität der LDF Ableitung wurde im Verlauf der Experimente in Gruppe G2 (Raumluft, Infusionstemperatur 4°C) eine stark erhöhte Mortalität (42,9%) im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen (0-10,0%) festgestellt (siehe Tabelle 1). Wir entschieden uns daher in dieser Gruppe auf die angestrebte Gruppengröße von 6 Tieren zu verzichten. Aus diesem Grund wurde Gruppe G2 nicht in die statistischen Analysen auf Gruppenebene aufgenommen. Die Ergebnisse der überlebenden Tieren in Gruppe G2 bei denen eine ausreichende LDF Qualität erreicht wurde (n=3) fließen jedoch in die gepoolte Analyse der Vitalparameter mit ein.

	Mortalität
G1: CTL	4/19 (21,1%)
G2: CI4°C RA	3/7 (42,9%)
G3: CI23°C RA	1/11 (9,1%)
G4: CI37°C RA	1/10 (10,0%)
G5: NBO	1/14 (7,1%)
G6: CI4°C NBO	1/10 (10,0%)
G7: CI23°C NBO	0/10 (0,0%)
G8: CI37°C NBO	0/10 (0,0%)

Tab. 1: Mortalität in den Versuchsgruppen unabhängig von der Qualität der LDF Ableitung

In Gruppe G2 zeigt sich eine stark erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe G1 und den anderen Therapiegruppen G3-8.

3.1. Ausgangsgewicht und MCAO Qualität

Das mittlere Ausgangsgewicht der Versuchstiere und wesentliche Qualitätsmerkmale der induzierten cerebralen Ischämie mittels MCAO (Verschlussdauer, des Abfalls des LDF Signals bei Ischämieinduktion und des Anstiegs des LDF Signals nach Einleitung der Reperfusion) waren über alle Versuchsgruppen ähnlich verteilt (siehe Tabelle 2).

Eine univariate Varianzanalyse zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Ausgangsgewicht $p=0,42$; Ischämiezeit $p=0,664$; LDF Reduktion $p=0,32$; LDF Anstieg $p=0,519$).

	Ausgangs- gewicht (g)	MCAO Dauer (min)	LDF Reduktion bei MCAO Beginn (%)	LDF Anstieg bei MCAO Ende (%)
G1: CTL	343,5 ± 15,85	101 ± 2,28	73,9 ± 7,3	72,9 ± 8,5
G2: CI4°C RA	343,33 ± 11,72	100 ± 0	66,6 ± 6,0	66,8 ± 8,5
G3: CI23°C RA	334 ± 17,62	99,83 ± 3,49	69,1 ± 6,4	71,7 ± 10,1
G4: CI37°C RA	343,67 ± 7,37	101,2 ± 5,67	72,4 ± 3,7	66,3 ± 6,7
G5: NBO	344,4 ± 11,93	98,67 ± 2,42	72,7 ± 2,6	71,1 ± 7,2
G6: CI4°C NBO	332,33 ± 11,43	96,83 ± 7,36	73,9 ± 5,8	74,0 ± 7,0
G7: CI23°C NBO	336,33 ± 9,18	98,5 ± 2,89	79,6 ± 8,6	76,3 ± 7,7
G8: CI37°C NBO	342 ± 6,96	98,4 ± 4,51	74,6 ± 7,7	74,5 ± 6,4

Tab. 2: Ausgangsgewicht der Versuchstiere und wesentliche MCAO-Qualitätsmerkmale in den Versuchsgruppen.

Beide Parameter unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen G1 und G3-8.

$n(G1, G3-G8) = 6$; $n(G2) = 3$

3.2. Infarktvolumen

Die Induktion von fokaler cerebraler Ischämie durch MCAO für 100 Minuten ohne neuroprotektive Therapie (G1) führte 24 Stunden nach dem Eingriff zu einem mittleren Infarktvolumen von $324,8 \pm 129,5 \text{ mm}^3$ (siehe Tabelle 3 und Abbildung 4). Die univariate Varianzanalyse der Infarktvolumina (siehe Abbildung 5) zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p < 0,001$). Für die Post-Hoc Testung

erfolgte eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni für 5 Vergleiche auf 0,0083.

Bei Monotherapie mit AI zeigte sich eine deutliche Temperaturabhängigkeit der neuroprotektiven Wirkung. Durch die intra-arterielle Infusion von 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung (G4) konnte die deutlichste Reduktion der Infarktgröße (-75%) erzielt werden. Dieser Effekt zeigte sich in der Post-Hoc Testung statistisch hochsignifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Eine Infusionstemperatur von 23°C führte zu einer wesentlich geringeren Reduktion des Infarktvolumens (-26%), ein Effekt der im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,12$). Trotz der geringen Gruppengröße in Gruppe 2, in der eine Infusionstemperatur von 4°C verwendet wurde ($n = 3$), deutet die mäßige Reduktion der mittleren Infarktgröße um nur 14% darauf hin, dass auch diese Infusionstemperatur hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Wirkung einer Infusion mit 37°C wahrscheinlich unterlegen ist.

Eine Behandlung mit 100% normobarem Sauerstoff in Gruppe G5 führte zu einer hochsignifikanten Reduktion des Infarktvolumens um 61% ($p < 0,001$). Durch eine Kombinationstherapie mit NBO und intra-arterieller Infusion konnte in den Gruppen G6 G7 und G8 unabhängig von der Infusionstemperatur eine weiteren Reduktion des mittleren Infarktvolumens erzielt werden (G6: -71%; G7: -70%; G8: -90%). Die durch die Kombinationstherapie erzielte Reduktion der Infarktvolumina unterschied sich jeweils hochsignifikant von der Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,001$). Eine separate univariate Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in denen NBO als Monotherapie (G5) oder Kombinationstherapie (G6-G8) angewendet wurde ($p = 0,083$).

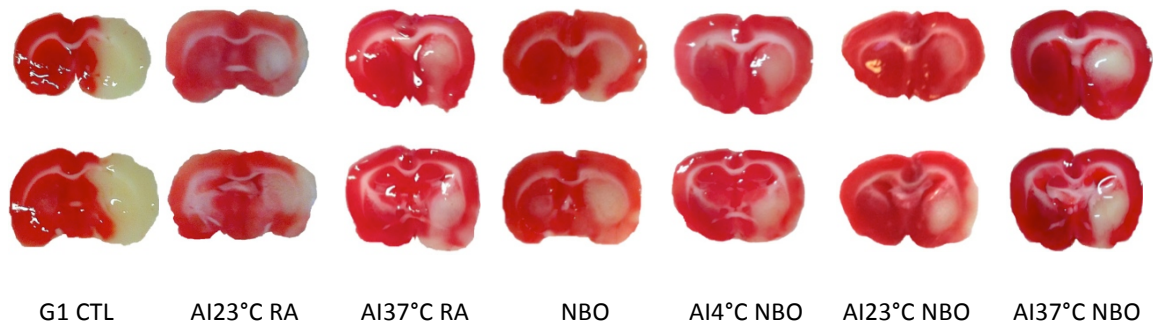


Abb. 4: Infarkt volumina 24 Stunden nach MCAO

Die abgebildeten Gewebeschnitte wurden mit TTC angefärbt. In dieser Färbung erscheint vitales Gewebe rot, während nicht metabolisch aktives (infarziertes) Gewebe ungefärbt bleibt.

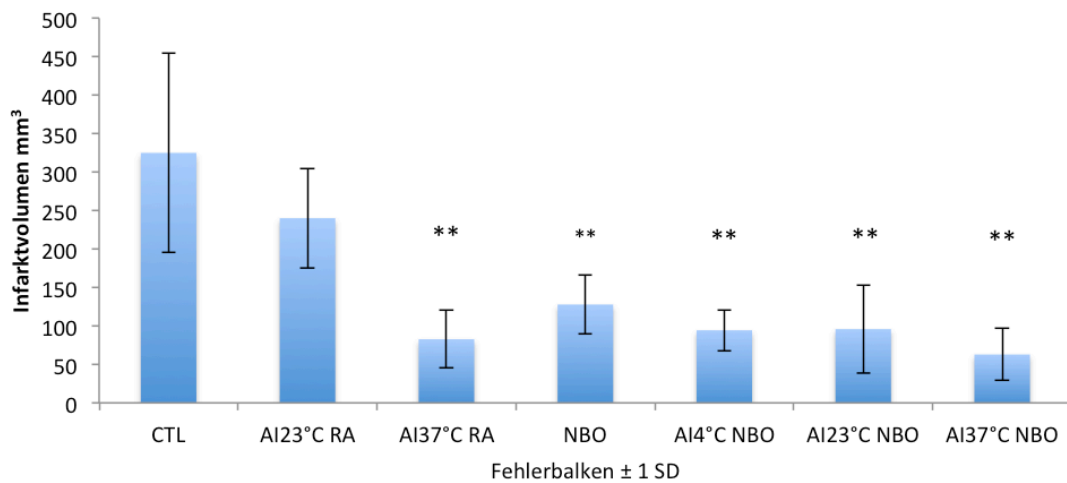


Abb. 5: Infarkt volumen 24 Stunden nach MCAO

Eine Monotherapie mit 37°C warmer AI (G4) oder NBO (G5) führte zu einer hochsignifikanten Reduktion des Infarkt volumens. Eine Kombinationstherapie mit AI und NBO zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Monotherapie mit NBO. n = 6 in allen dargestellten Gruppen

** hochsignifikant gegenüber G1 (p<0,001)

	Infarktvolumen (mm³)	Ödemvolumen (mm³)	Gewichtsverlust(g)
G1: CTL	324,83 ± 129,52	124,49 ± 53,4	42 ± 8,99
G2: AI4°C RA	279,98 ± 148,63	131,01 ± 93,06	48,67 ± 8,02
G3: AI23°C RA	239,99 ± 64,69	143,59 ± 91,21	40,67 ± 10,46
G4: AI37°C RA	82,67 ± 37,22**	47,1 ± 33,18	34,5 ± 9,85
G5: NBO	127,82 ± 38,17**	61,98 ± 32,04	43,6 ± 13,56
G6: AI4°C NBO	94,32 ± 26,76**	57,12 ± 29,4	41,5 ± 9,25
G7: AI23°C NBO	95,83 ± 57,13**	60,53 ± 36,67	39 ± 6,56
G8: AI37°C NBO	62,85 ± 33,8**	59,49 ± 45,83	40,8 ± 10,26

Tab. 3: Einfluss der Versuchsgruppe auf das Infarktvolumen, das Ödemvolumen und den Gewichtsverlust 24 Stunden nach MCAO. n(G1, G3-G8) = 6; n(G2) = 3

** hochsignifikant gegenüber G1 (p<0,001)

3.3. Ödemvolumen

In unserem Versuchsmodell kam es in der Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO zu einem mittleren Volumen des Infarktödems von $124,5 \pm 53,4 \text{ mm}^3$ (siehe Tabelle 3). Eine Behandlung mit intra-arterieller Infusion führte bei einer Infusionstemperatur von 37°C (G4) zu einer Reduktion des mittleren Ödemvolumens um 62% gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6). Ähnlich der Reduktion der Infarktvolumina zeigte sich eine Temperaturabhängigkeit der ödemreduzierenden Wirkung von AI. Bei einer verminderten Infusionstemperatur von 23°C kalter Infusion (G3) war keine Reduktion des Ödemvolumens nachweisbar. Soweit beurteilbar scheint eine Infusion mit 4°C (G2) ebenso zu keiner Reduktion des Infarktödems zu führen.

Die Anwendung von NBO (G5) verminderte das Ödemvolumen um 50% gegenüber der Kontrollgruppe. Eine Kombinationstherapie mit NBO und intra-arterieller Infusion (G6-8) führte im Vergleich zur Monotherapie mit NBO zu keiner relevanten Steigerung der anti-ödematösen Wirkung (-51% bis -54% gegenüber der Kontrollgruppe). Die Infusionstemperatur hatte in den mit Kombinationstherapie behandelten Gruppen keinen Einfluss auf das Ödemvolumen.

Eine univariate Varianzanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich des Ödemvolumens (p=0,008). Für die Post-Hoc Testung erfolgte für 5 Vergleiche eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni auf 0,0083. In den Post-hoc Vergleichen fanden sich keine signifikanten Unterschiede

zwischen der Kontrollgruppe G1 und einer der Behandlungsgruppen (G3-8) (jeweils $p > 0,05$).

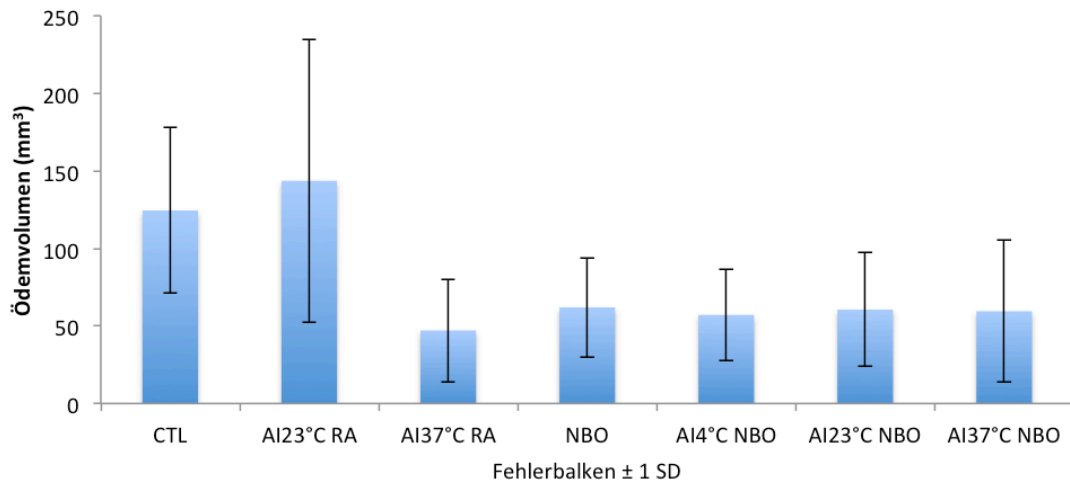


Abb. 6: Ödemvolumen 24 Stunden nach MCAO

Eine Monotherapie mit 37°C warmer AI (G4) oder NBO (G5) oder eine Kombinationstherapie mit AI und NBO (G6-8) führten zu einer nicht signifikanten Reduktion des Ödemvolumens. $n = 6$ in allen dargestellten Gruppen

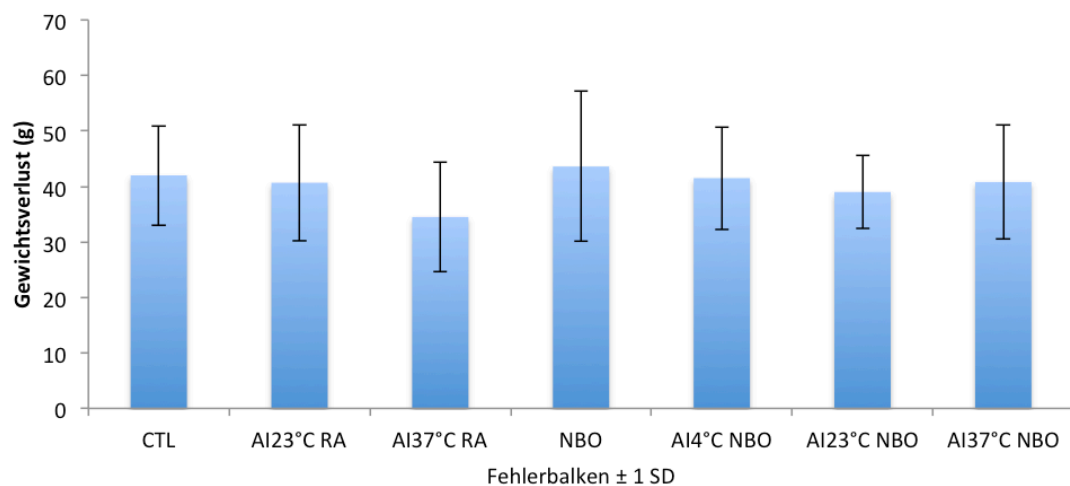


Abb. 7: Gewichtsverlust 24 Stunden nach MCAO

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. $n = 6$ in allen dargestellten Gruppen

3.4. Gewichtsverlust

Der beobachtete mittlere Gewichtsverlust 24 Stunden nach MCOA (siehe Tabelle 3) betrug 10-14% des Ausgangsgewichts und war über alle Versuchsgruppen ähnlich verteilt. Eine univariate Varianzanalyse (siehe Abbildung 7) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p=0,828$).

3.5. Funktionelle Testergebnisse

Alle Versuchstiere wurden vor dem operativen Eingriff und 24h nach MCAO einer Verhaltenstestung anhand von 4 standardisierten Tests unterzogen. Die Testergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt. Eine statistische Analyse der funktionellen Testergebnisse mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte zu keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Testergebnissen der Versuchsgruppen (Tail Swing Test: (Baseline) $p=0,157$; (24h) $p=0,129$. Corner Turn Test: (Baseline) $p=0,149$; (24h) $p=0,668$. Forelimb Placement Test: (Baseline) $p=1,0$; (24h) $p=0,598$. Neuroscore Test: (Baseline) $p=1,0$; (24h) $p=0,129$).

Zur besseren Visualisierung wurden die Testergebnisse des „Body Swing Test“, des „Corner Turn Test“ und des „Forelimb Placement Test“ in eine 4-teilige Behinderungsskala eingeteilt (0=kein Defizit; 3=schweres Defizit) (siehe Abschnitt 2.4). Die Verteilung des funktionellen Defizits in den Versuchsgruppen G1 und G3-8 wird anhand dieser Skala in Abbildung 8 dargestellt.

	Forelimb			
	Body Swing Test	Corner Turn Test	Placement Test	Neuroscore Test
G1: CTL	1,5 (0,75; 3,75)	1 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G2: AI4°C RA	3 (1; 3)	1 (1; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G3: AI23°C RA	1 (0; 2,75)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G4: AI37°C RA	4,5 (1,75; 5,25)	0,5 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G5: NBO	0 (0; 1,5)	0 (0; 0,5)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G6: AI4°C NBO	4 (0,75; 8,25)	1,5 (0; 2,25)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G7: AI23°C NBO	0 (0; 3)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
G8: AI37°C NBO	2 (0,75; 8)	1 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)

A

	Forelimb			
	Body Swing Test	Corner Turn Test	Placement Test	Neuroscore Test
G1: CTL	10 (4,75; 15)	4 (1,5; 5)	5,5 (4; 7,25)	2,5 (1; 3)
G2: AI4°C RA	10 (5; 10)	5 (4; 5)	6 (3; 6)	3 (2; 3)
G3: AI23°C RA	11 (4; 15)	4 (1,5; 5)	6 (2; 7)	2 (2; 2,75)
G4: AI37°C RA	13,5 (9,75; 15)	3 (1; 5)	6 (2,75; 7,25)	2,5 (1,75; 3)
G5: NBO	10 (2,5; 14,5)	5 (3; 5)	5 (0,5; 5,5)	3 (0,5; 3)
G6: AI4°C NBO	7 (3; 14,25)	4,5 (1,75; 5)	5,5 (1,5; 7,25)	2 (0,75; 3)
G7: AI23°C NBO	3 (1,5; 7)	4 (1,5; 5)	3 (0; 5,75)	0 (0; 1,25)
G8: AI37°C NBO	8 (4; 9,25)	5 (4,5; 5)	3,5 (0; 6,25)	2 (1; 3)

B

Tab. 4: Funktionelle Testergebnisse vor (A) und 24h nach MCAO (B)

Die Angabe erfolgt als Median und 25% sowie 75% Perzentile. Die statistische Testung mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte zu keinem der Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen G1 und G3-8. n(G1, G3-G8) = 6; n(G2) = 3



Abb. 8: Ergebnisse der funktionellen Testung anhand des Body Swing Test (A), Corner Turn Test (B), Forelimb Placement Test (C) und des Neuroscore Test (D) jeweils vor (1) und 24h nach MCAO (2). Die statistische Prüfung ergab für keinen der Tests einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Zur besseren Visualisierung wurden die Testergebnisse in eine 4-teilige Behinderungsskala überführt (kein Defizit – schweres Defizit). n = 6 in allen dargestellten Gruppen.

3.6. Vitalparameter

Während der operativen Eingriffe wurden die Vitalparameter der Versuchstiere (siehe Tabelle 5) entweder an drei festgelegten Zeitpunkten (1) vor MCAO Beginn (Baseline), (2) während MCAO (60min) und (3) während der Reperfusionphase (115min) gemessen (PaO₂, SpO₂, PaCO₂, pH, Na, K, SAP, MAP, HF, Hct, Hb) oder kontinuierlich während des gesamten Eingriffs überwacht (T_{rect}).

Um statistisch signifikante Unterschiede feststellen zu können wurden für ausgewählte Vitalparameter (PaO₂, PaCO₂, MAP, HF, Hct, T_{rect}) zwei gepoolte Analysen durchgeführt.

In der ersten Analyse (siehe Tabelle 6) wurden alle Gruppen mit Raumluft als Atemgas (G1-4, n=21) mit allen NBO Gruppen (G5-8, n=24) verglichen. Aufgrund von Mehrfachvergleichen wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni für 18 Vergleiche auf 0,0028 durchgeführt. In den NBO Gruppen (siehe Abbildung 9-A) zeigten sich über die gesamte Versuchsperiode hochsignifikant erhöhte arterielle Sauerstoffkonzentrationen: (Baseline) 72,8 ± 6,1 vs. 438,9 ± 64,5 mmHg; (60min) 63,6 ± 7,3 vs. 434,7 ± 59,5 mmHg; (115min) 56 ± 9,7 vs. 430,2 ± 66,7 mmHg; jeweils p<0,001. Die Applikation von AI hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis (Abbildung 9-B und Tabelle 8).

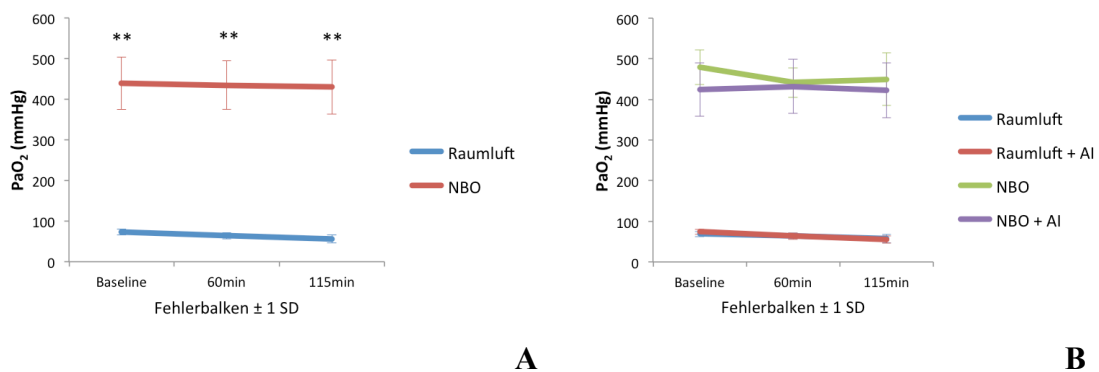


Abb. 9: Auswirkung des Atemgases auf die arterielle Sauerstoffkonzentration

A: Die Anwendung von NBO führt zu einer hochsignifikanten Erhöhung der arteriellen Sauerstoffkonzentration während des gesamten operativen Eingriffs. n(Raumluft) = 21; n(NBO) = 24

B: Die Anwendung von AI hat keinen relevanten Einfluss auf dieses Ergebnis.

n(Raumluft) = 6; n(Raumluft+AI) = 15; n(NBO) = 6; n(NBO+AI) = 18

Im Verlauf des operativen Eingriffs kam es in den NBO-Gruppen zu einem kontinuierlichen Anstieg der arteriellen Kohlendioxidkonzentration (siehe Abbildung 10-A). Während vor Ischämieinduktion noch keine signifikante Erhöhung zwischen den Gruppen G1-4 (Raumluft) und den Gruppen G5-8 (NBO) vorlag ($37,5 \pm 5,0$ vs. $43,2 \pm 7,0$ mmHg $p=0,004$), waren die Werte während MCAO ($37,5 \pm 5,2$ vs. $49,0 \pm 8,3$ mmHg $p<0,001$) und in der Reperfusionphase ($41,0 \pm 5,7$ vs. $56,5 \pm 13,3$ mmHg $p<0,001$) hochsignifikant erhöht.

Diese Erhöhung der arterielle Kohlendioxidkonzentration war unabhängig von der Anwendung von AI: Gesteigerte PaCO₂ Werte konnte in den NBO Gruppen (G5-8) sowohl bei Monotherapie (G5) als auch bei Kombination mit AI (G6-8) beobachtet werden. Auch bei Verwendung von Raumluft als Atemgas (G1-4) fanden sich keine relevanten Unterschiede in den Mittelwerten des PaCO₂ zwischen der Kontrollgruppe (G1) und den AI Gruppen (G2-4). (Abbildung 10-B und Tabelle 8).

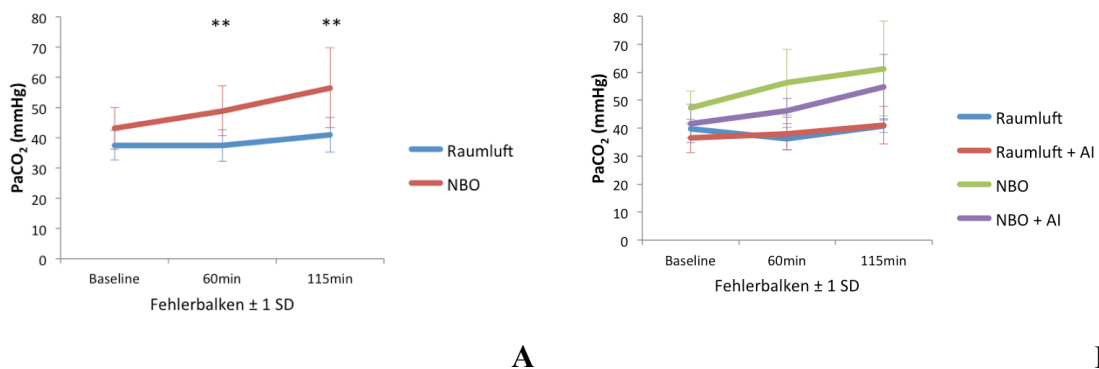


Abb. 10: Auswirkung des Atemgases auf die arterielle Kohlendioxidkonzentration

A: Die Anwendung von NBO führt zu einer hochsignifikanten Erhöhung der arteriellen Kohlendioxidkonzentration während der Ischämie und Reperfusionphase.

n(Raumluft) = 21; n(NBO) = 24

B: Die Anwendung von AI hat keinen relevanten Einfluss auf dieses Ergebnis.

n(Raumluft) = 6; n(Raumluft+AI) = 15; n(NBO) = 6; n(NBO+AI) = 18

Die anderen getesteten Parameter (siehe Abbildung 11) wiesen zu keinem der Zeitpunkte statistisch signifikante Unterschiede auf (Hct: (Baseline) $p=0,835$; (60min) $p=0,319$; (115min) $p=0,909$. MAP: (Baseline) $p=0,004$; (60min) $p=0,197$; (115min) $p=0,04$. HF: (Baseline) $p=0,154$; (60min) $p=0,77$; (115) $p=0,79$. T_{rect} : (Baseline) $p=0,2$; (Intraischämisch) $p=0,559$; (Reperfusion) $p=0,321$).

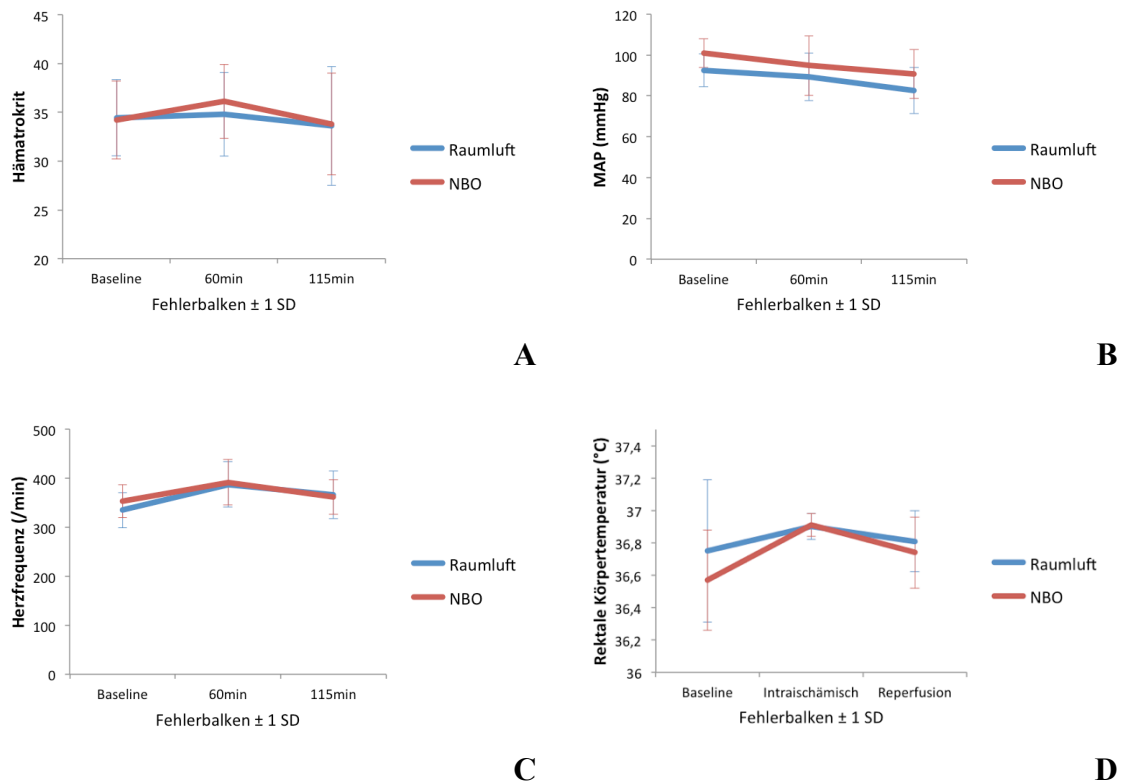


Abb. 11: Auswirkungen des Atemgases auf verschiedene Vitalparameter

A: Hämatokrit **B:** MAP **C:** Herzfrequenz **D:** Rektale Körpertemperatur. Keiner der Parameter wies zu einem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf. $n(\text{Raumluft}) = 21$; $n(\text{NBO}) = 24$

In der zweiten Analyse wurden alle Gruppen ohne intra-arterielle Infusion (G1, G5 $n=12$) mit allen AI-Gruppen (G2-4, G6-8 $n=33$) verglichen (siehe Tabelle 7). Aufgrund von Mehrfachvergleichen wurde eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni für 18 Vergleiche auf 0,0028 durchgeführt. In dieser Analyse konnte bei ähnlichen Hämatokritwerten vor Ischämieinduktion ($35,6 \pm 2,9$ vs. $33,8 \pm 4,2$ $p=0,128$) und während MCAO ($36,8 \pm 5,0$ vs. $34,9 \pm 3,5$ $p=0,238$) eine hochsignifikante

Reduktion des Hämatokritwertes während der Applikation von Post-Reperfusionen AI in der Reperfusionphase ($38,4 \pm 4,8$ vs. $31,5 \pm 4,5$ $p < 0,001$) festgestellt werden (siehe Abbildung 12-A).

Die Reduktion des Hämatokritwertes in den AI-Gruppen (G2-4, G6-8) war unabhängig davon ob Raumluft (G2-4) oder NBO (G6-8) als Atemgas verwendet wurde (siehe Abbildung 12-B und Tabelle 8). Die Temperatur der verwendeten Infusionslösung (4°C in G2, G6; 23°C in G3, G7; 37°C in G4, G8) zeigte ebenso keinen Effekt auf dieses Ergebnis (siehe Abbildung 12-C und Tabelle 9).

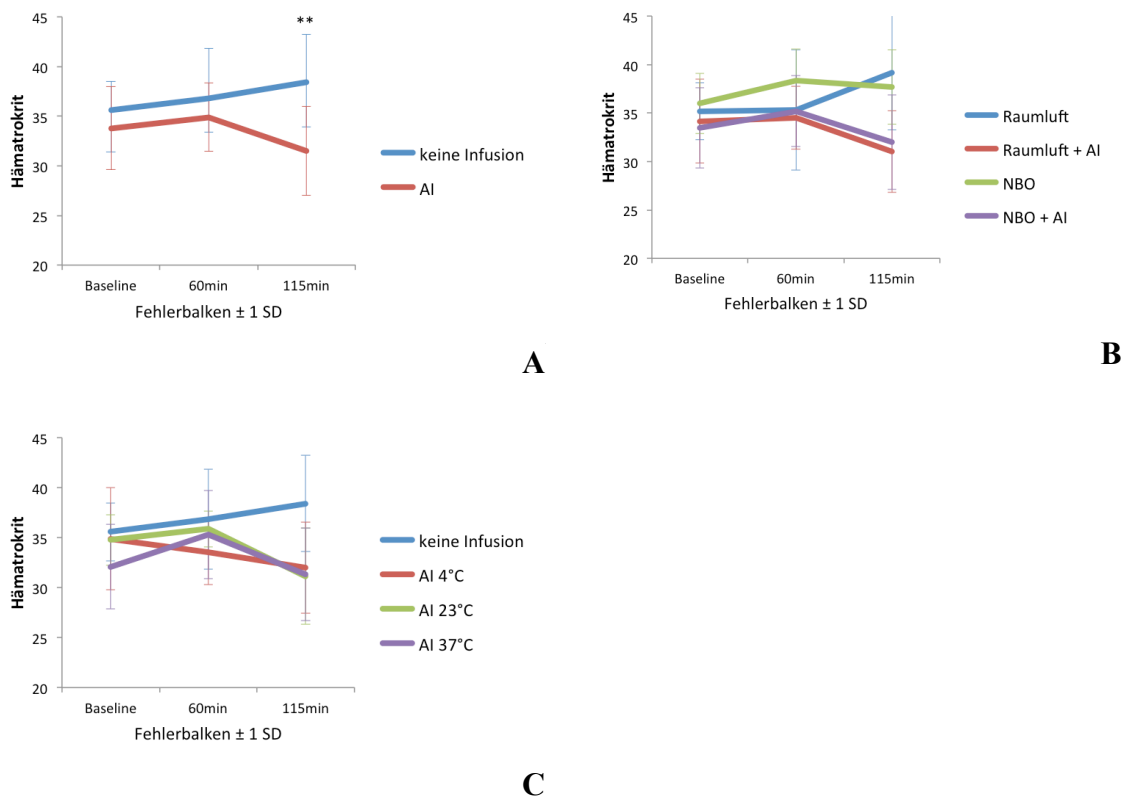


Abb. 12: Auswirkungen von AI auf den systemischen Hämatokrit

A: Anwendung von AI in der Reperfusionperiode (115min) führt zu einem hochsignifikanten Absinken des Hämatokrit. $n(\text{keine Infusion}) = 12$; $n(\text{AI}) = 33$

** $p < 0,001$

B: Dieser Effekt ist unabhängig vom Atemgas (Raumluft oder NBO).

$n(\text{Raumluft}) = 6$; $n(\text{Raumluft+AI}) = 15$; $n(\text{NBO}) = 6$; $n(\text{NBO+AI}) = 18$

C: Die Temperatur der Infusionslösung beeinflusst das Absinken des Hämatokrit nicht.

$n(\text{keine Infusion}) = 12$; $n(\text{AI } 4^{\circ}\text{C}) = 9$; $n(\text{AI } 23^{\circ}\text{C}) = 12$; $n(\text{AI } 37^{\circ}\text{C}) = 12$

Die durchschnittliche rektale Körpertemperatur (siehe Abbildung 13-A) wurde durch die Anwendung von intra-arteriellen Infusionen in keiner der 3 Messperioden signifikant beeinflusst: (Baseline) $p=0,659$; (Intraischämisch) $p=0,128$; (Reperfusion) $p=0,382$. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Temperatur der verwendeten Infusionslösung (siehe Abbildung 13-B und Tabelle 9).

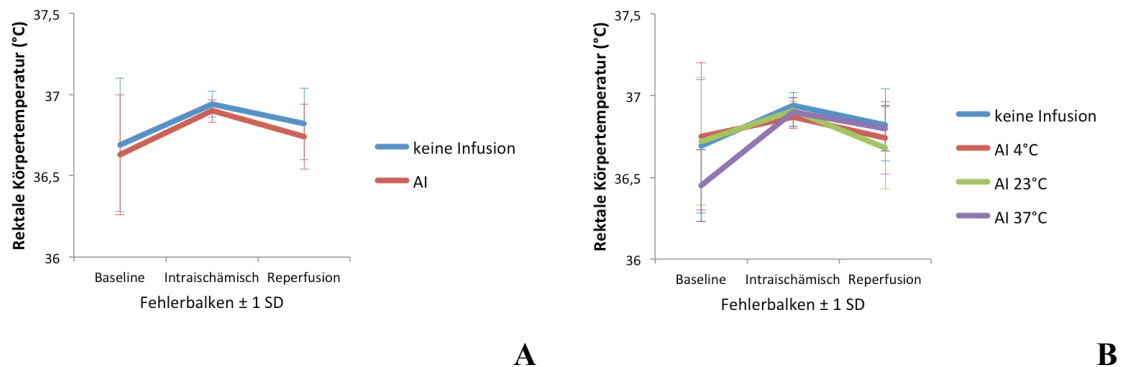


Abb. 13: Auswirkungen von AI auf die rektale Körpertemperatur

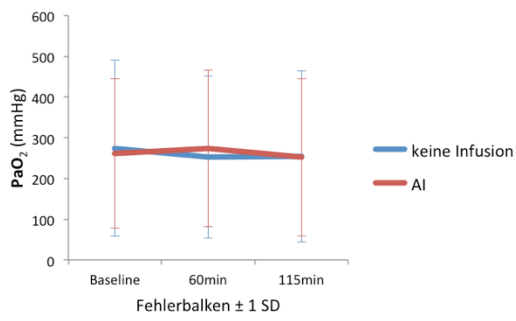
A: Die Anwendung von AI hat keinen signifikanten Einfluss auf die rektale Körpertemperatur.

$n(\text{keine Infusion}) = 12$; $n(\text{AI}) = 33$

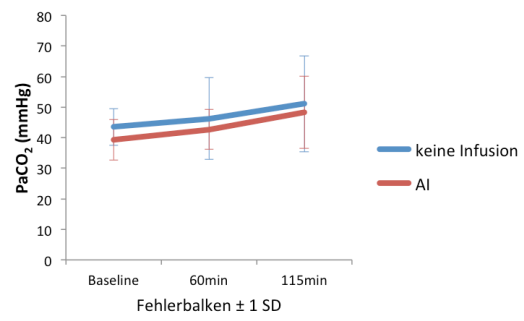
B: Dieser Effekt wird von der Temperatur der verwendeten Infusionslösung nicht relevant beeinflusst.

$n(\text{keine Infusion}) = 12$; $n(\text{AI } 4^{\circ}\text{C}) = 9$; $n(\text{AI } 23^{\circ}\text{C}) = 12$; $n(\text{AI } 37^{\circ}\text{C}) = 12$

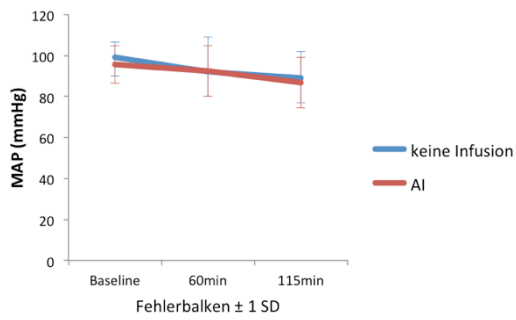
Die anderen getesteten Parameter (siehe Abbildung 14) wiesen zu keinem der Zeitpunkte statistisch signifikante Unterschiede auf. (SpO₂: (Baseline) $p=0,854$; (60min) $p=0,756$; (115min) $p=0,978$. SpCO₂: (Baseline) $p=0,055$; (60min) $p=0,395$; (115min) $p=0,596$. MAP: (Baseline) $p=0,27$; (60min) $p=0,976$; (115min) $p=0,625$. HF: (Baseline) $p=0,261$; (60min) $p=0,968$; (115) $p=0,725$)



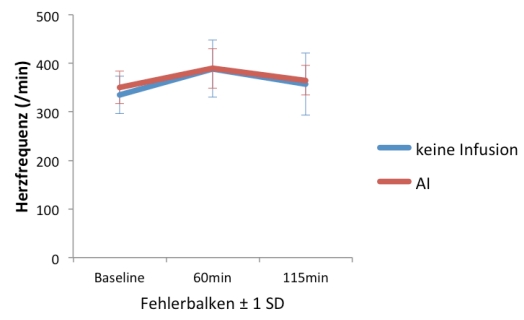
A



B



C



D

Abb. 14: Auswirkungen Atemgases auf verschiedene Vitalparameter

A: SpO₂ B: SpCO₂ C: MAP D: Herzfrequenz Keiner der Parameter wies zu einem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf.

n(keine Infusion) = 12; n(AI) = 33

	PaO2 (mmHg)			SpO2 (%)			PaCO2 (mmHg)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
G1: CTL	68,83 ± 6,49	63,83 ± 6,79	57,67 ± 10,65	93,83 ± 1,47	92,33 ± 2,88	88,5 ± 5,75	39,77 ± 3,26	36,22 ± 3,95	40,85 ± 2,46
G2: A14°C RA	77 ± 5,57	65,67 ± 2,31	64,67 ± 5,51	97 ± 2,65	92,67 ± 0,58	92,33 ± 2,08	41 ± 3,24	34,9 ± 4,36	37,33 ± 7,83
G3: A123°C RA	77,2 ± 7,89	66 ± 10,61	56,5 ± 9,75	96 ± 1	93 ± 2,16	88,25 ± 3,86	36,64 ± 3,94	38,68 ± 3,91	39,28 ± 3,45
G4: A137°C RA	71 ± 4,34	60,2 ± 7,69	49,67 ± 7,81	94 ± 1,55	90,2 ± 3,27	81,5 ± 9,22	34,2 ± 6,25	39,5 ± 7,86	44,07 ± 7,58
G5: NBO	479,17 ± 42,8	441,67 ± 36,37	450 ± 65,38	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	47,27 ± 5,92	56,32 ± 11,76	61,25 ± 16,85
G6: A14°C NBO	409,17 ± 71,18	434,67 ± 59,66	428,17 ± 51,81	100 ± 0	100 ± 0	106,67 ± 16,33	40,1 ± 6,84	44,32 ± 5,11	54,27 ± 6,32
G7: A123°C NBO	467,4 ± 29,37	474,4 ± 18,04	459,6 ± 51,09	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	46,02 ± 5,18	46,88 ± 4,57	54,32 ± 9,84
G8: A137°C NBO	397,8 ± 73,85	386,8 ± 84,96	366,75 ± 83,72	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	39 ± 7,28	47,64 ± 3,93	55,6 ± 21,11

	pH			Na (mmol/L)			K (mmol/L)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
G1: CTL	7,43 ± 0,02	7,43 ± 0,04	7,42 ± 0,03	141,83 ± 3,37	144,33 ± 4,5	141,67 ± 2,8	3,53 ± 0,23	3,65 ± 0,69	3,88 ± 0,41
G2: A14°C RA	7,41 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,4 ± 0,01	143,33 ± 3,51	142,67 ± 2,31	147 ± 6	3,67 ± 0,51	3,6 ± 0,6	3,6 ± 1
G3: A123°C RA	7,45 ± 0,01	7,44 ± 0,02	7,4 ± 0,02	141,6 ± 1,95	140,75 ± 1,5	144,25 ± 1,5	3,84 ± 0,59	4 ± 0,16	3,68 ± 0,34
G4: A137°C RA	7,41 ± 0,03	7,41 ± 0,04	7,37 ± 0,03	145 ± 3,41	144,6 ± 3,44	144 ± 3,9	3,17 ± 0,56	3,86 ± 0,74	3,78 ± 1,03
G5: NBO	7,43 ± 0,04	7,37 ± 0,09	7,32 ± 0,1	140,17 ± 2,79	137,17 ± 1,17	139,83 ± 3,92	3,88 ± 0,37	4,68 ± 0,42	4,67 ± 0,76
G6: A14°C NBO	7,41 ± 0,03	7,39 ± 0,02	7,33 ± 0,04	145,5 ± 3,73	144,17 ± 5,46	120,22 ± 56,9	3,03 ± 0,59	3,75 ± 0,71	4,02 ± 0,48
G7: A123°C NBO	7,41 ± 0,02	7,41 ± 0,06	7,34 ± 0,04	139,75 ± 2,22	141 ± 1,83	144 ± 5,72	3,7 ± 0,22	3,77 ± 0,29	3,73 ± 0,78
G8: A137°C NBO	7,42 ± 0,03	7,38 ± 0,07	7,28 ± 0,17	143,6 ± 3,44	143,6 ± 3,65	147 ± 4,24	3,22 ± 0,62	4,08 ± 0,52	3,2 ± 0,1

Tab. 5. Vitalparameter in den Versuchsgruppen

n(G1, G3-G8) = 6; n(G2) = 3

	SAP (mmHg)			MAP (mmHg)			HF (/min)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
G1: CTL	123,33 ± 11,45	125,33 ± 18,57	117,8 ± 12,32	94,17 ± 5,46	94,33 ± 18,32	89,4 ± 15,32	320,33 ± 38,28	391 ± 71,79	375,6 ± 77,76
G2: CI4°C RA	150	113 ± 2,83	121 ± 26,87	112	83,5 ± 0,71	86,5 ± 13,44	383	412 ± 41,01	363 ± 32,53
G3: CI23°C RA	117 ± 11,34	127,25 ± 5,25	111,75 ± 6,13	90 ± 7,35	90,75 ± 3,77	75,5 ± 6,4	350,8 ± 35,79	389 ± 30,23	350,75 ± 45,1
G4: CI37°C RA	109,33 ± 2,31	110,4 ± 5,13	105,8 ± 7,53	87 ± 3	84,4 ± 5,41	79,8 ± 6,83	322 ± 14,53	371,2 ± 22,39	368,6 ± 26,82
G5: NBO	135,5 ± 10,5	118 ± 20,87	126,2 ± 20,83	104 ± 5,69	89,8 ± 16,77	88,8 ± 12,03	349,67 ± 35,33	386,8 ± 47,51	339,8 ± 49,38
G6: CI4°C NBO	126,2 ± 12,87	118,5 ± 13,17	120,33 ± 7,66	102,4 ± 6,66	91,67 ± 10,03	89,33 ± 7,53	365,2 ± 32,08	380 ± 53,22	348,17 ± 29,78
G7: CI23°C NBO	123,33 ± 9,07	126,6 ± 14,55	117,83 ± 14,34	97,33 ± 8,33	91 ± 7,38	87,17 ± 9,77	321,33 ± 33,84	375,2 ± 36,6	378,83 ± 25,38
G8: CI37°C NBO	117 ± 14,8	137,6 ± 20,6	122,17 ± 24,47	96 ± 9,17	107,8 ± 18,23	97,17 ± 17,49	371,67 ± 15,31	427 ± 39,69	376,67 ± 27,13
	Hct			Hb (g/dl)			Rektale Temperatur (°C)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	Intraischämisch	Reperfusion
G1: CTL	35,17 ± 2,93	35,33 ± 6,22	39,17 ± 5,91	11,97 ± 0,99	12,02 ± 2,11	13,32 ± 2	36,83 ± 0,48	36,98 ± 0,1	36,83 ± 0,09
G2: AI4°C RA	37,67 ± 3,21	32 ± 1,73	28,67 ± 4,51	12,83 ± 1,08	10,87 ± 0,58	9,77 ± 1,5	37,34 ± 0,52	36,79 ± 0,02	36,85 ± 0,07
G3: AI23°C RA	34,2 ± 3,11	35,75 ± 1,71	30 ± 3,83	11,64 ± 1,04	12,15 ± 0,56	10,2 ± 1,29	36,65 ± 0,44	36,93 ± 0,05	36,66 ± 0,31
G4: AI37°C RA	32,33 ± 5,05	35 ± 4,3	32,83 ± 4,22	11,02 ± 1,71	11,92 ± 1,45	11,17 ± 1,45	36,52 ± 0,22	36,86 ± 0,04	36,88 ± 0,12
G5: NBO	36 ± 3,1	38,33 ± 3,27	37,67 ± 3,83	12,25 ± 1,07	13,05 ± 1,11	12,8 ± 1,3	36,6 ± 0,37	36,92 ± 0,06	36,81 ± 0,29
G6: AI4°C NBO	33,5 ± 5,54	34,33 ± 3,72	33,67 ± 3,88	11,38 ± 1,86	11,67 ± 1,25	11,45 ± 1,31	36,55 ± 0,21	36,9 ± 0,05	36,71 ± 0,24
G7: AI23°C NBO	35,5 ± 1,73	36 ± 2,16	32,25 ± 6,02	12,05 ± 0,6	12,25 ± 0,74	10,98 ± 2,02	36,8 ± 0,38	36,9 ± 0,05	36,69 ± 0,23
G8: AI37°C NBO	31,8 ± 3,56	35,6 ± 4,98	28,33 ± 4,73	10,8 ± 1,23	12,1 ± 1,67	9,63 ± 1,63	36,38 ± 0,22	36,94 ± 0,12	36,73 ± 0,13

Tab. 5. (Fortsetzung): Vitalparameter in den Versuchsgruppen.

n(G1, G3-G8) = 6; n(G2) = 3

	PaO ₂ (mmHg)			PaCO ₂ (mmHg)			Hct		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
Raumluft	72,8 ± 6,8	63,61 ± 7,32	56 ± 9,72	37,5 ± 4,96	37,46 ± 5,23	40,98 ± 5,7	34,45 ± 3,91	34,78 ± 4,28	33,58 ± 6,07
NBO	438,91 ± 64,48**	434,73 ± 59,45**	430,19 ± 66,73**	43,15 ± 6,95	48,93 ± 8,31**	56,53 ± 13,3**	34,19 ± 4	36,1 ± 3,78	33,79 ± 5,22

	MAP (mmHg)			HF (min)			Rektale Temperatur (°C)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	Intraischämisch	Reperfusion
Raumluft	92,53 ± 8,03	89,29 ± 11,69	82,56 ± 11,35	335 ± 36,08	387,18 ± 46,64	365,63 ± 48,76	36,75 ± 0,44	36,9 ± 0,08	36,81 ± 0,19
NBO	100,94 ± 7,18	94,9 ± 14,62	90,7 ± 12,1	353,12 ± 33,52	391,67 ± 46,57	361,78 ± 35,48	36,57 ± 0,31	36,91 ± 0,07	36,74 ± 0,22

Tab. 6: Ausgewählte Vitalparameter in den Versuchsgruppen mit Raumluft (G1-4) und NBO (G5-8) als Beatmungsgas

In der gesamten Versuchsperiode führte Beatmung mit NBO zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im arteriellen Blut. Während der Ischämiephase und nach Reperfusion führte NBO zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Kohlendioxidpartialdrucks im arteriellen Blut. n(G1-4) = 21; n(G5-8) = 24
**p<0,001

	PaO ₂ (mmHg)			PaCO ₂ (mmHg)			Hct		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
keine Infusion	274 ± 216,27	252,75 ± 198,89	253,83 ± 209,7	43,52 ± 6,01	46,27 ± 13,42	51,05 ± 15,66	35,58 ± 2,91	36,83 ± 4,99	38,42 ± 4,81
AI	260,8 ± 183,49	274,14 ± 192,42	251,86 ± 192,81	39,24 ± 6,6	42,69 ± 6,47	48,33 ± 11,82	33,79 ± 4,19	34,89 ± 3,45	31,5 ± 4,5**

	MAP (mmHg)			HF (min)			Rektale Temperatur (°C)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	Intraischämisch	Reperfusion
keine Infusion	99,08 ± 7,39	92,27 ± 16,91	89,1 ± 12,99	335 ± 38,31	389,09 ± 59,03	357,7 ± 64,24	36,69 ± 0,41	36,94 ± 0,08	36,82 ± 0,22
AI	95,75 ± 9,19	92,44 ± 12,25	86,76 ± 12,28	350,4 ± 33,16	389,89 ± 40,92	365,31 ± 30,43	36,63 ± 0,37	36,9 ± 0,07	36,74 ± 0,2

Tab. 7: Ausgewählte Vitalparameter in den Versuchsgruppen ohne AI (G1, G5) und mit AI (G2-4, G6-8)

Während der Reperfuionsperiode, in der die intra-arterielle Infusion angewendet wurde, kam es zu einer hochsignifikanten Reduktion des Hämatokrit-Wertes. n(G1,G5) = 12; n(G2-4, G6-8) = 33 **p<0,001

	PaO ₂ (mmHg)			PaCO ₂ (mmHg)			Hct		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
Raumluft	68,83 ± 6,49	63,83 ± 6,79	57,67 ± 10,65	39,77 ± 3,26	36,22 ± 3,95	40,85 ± 2,46	35,17 ± 2,93	35,33 ± 6,22	39,17 ± 5,91
Raumluft + AI	74,5 ± 6,41	63,5 ± 7,86	55,23 ± 9,62	36,53 ± 5,34	38,08 ± 5,82	41,04 ± 6,8	34,14 ± 4,33	34,5 ± 3,23	31 ± 4,22
NBO	479,17 ± 42,8	441,67 ± 36,37	450 ± 65,38	47,27 ± 5,92	56,32 ± 11,76	61,25 ± 16,85	36 ± 3,1	38,33 ± 3,27	37,67 ± 3,83
NBO + AI	423,81 ± 65,71	432,13 ± 66,94	422,27 ± 67,82	41,61 ± 6,82	46,16 ± 4,54	54,64 ± 11,74	33,47 ± 4,17	35,2 ± 3,69	32 ± 4,88

	MAP (mmHg)			HF (/min)			Rektale Temperatur (°C)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	Intraischämisch	Reperfusion
Raumluft	94,17 ± 5,46	94,33 ± 18,32	89,4 ± 15,32	320,33 ± 38,28	391 ± 71,79	375,6 ± 77,76	36,83 ± 0,48	36,98 ± 0,1	36,83 ± 0,09
Raumluft + AI	91,44 ± 9,53	86,55 ± 5,22	79,45 ± 8,08	344,78 ± 33,06	385,09 ± 29,84	361,09 ± 32,79	36,72 ± 0,45	36,87 ± 0,06	36,8 ± 0,22
NBO	104 ± 5,69	89,8 ± 16,77	88,8 ± 12,03	349,67 ± 35,33	386,8 ± 47,51	339,8 ± 49,38	36,6 ± 0,37	36,92 ± 0,06	36,81 ± 0,29
NBO + AI	99,27 ± 7,59	96,5 ± 14,09	91,22 ± 12,42	355 ± 34,1	393,19 ± 47,75	367,89 ± 29,56	36,56 ± 0,29	36,91 ± 0,08	36,71 ± 0,19

Tab. 8: Ausgewählte Vitalparameter abhängig von Atemgas und der Anwendung von AI
n(Raumluft) = 6; n(Raumluft + AI) = 15; n(NBO) = 6; n(NBO + AI) = 18

	PaO ₂ (mmHg)			PaCO ₂ (mmHg)			Hct		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min
keine Infusion	274 ± 216,27	252,75 ± 198,89	253,83 ± 209,7	43,52 ± 6,01	46,27 ± 13,42	51,05 ± 15,66	35,58 ± 2,91	36,83 ± 4,99	38,42 ± 4,81
AI 4°C	298,44 ± 175,38	311,67 ± 190,44	307 ± 186,33	40,4 ± 5,66	41,18 ± 6,57	48,62 ± 10,58	34,89 ± 5,11	33,56 ± 3,28	32 ± 4,56
AI 23°C	272,3 ± 206,65	292,89 ± 215,72	280,44 ± 215,58	41,33 ± 6,58	43,23 ± 5,91	47,63 ± 10,76	34,78 ± 2,54	35,88 ± 1,81	31,13 ± 4,82
AI 37°C	219,55 ± 176,97	223,5 ± 181,28	176,5 ± 170,83	36,38 ± 6,86	43,57 ± 7,26	48,68 ± 14,7	32,09 ± 4,23	35,3 ± 4,4	31,33 ± 4,66

	MAP (mmHg)			HF (/min)			Rektale Temperatur (°C)		
	Baseline	60min	115min	Baseline	60min	115min	Baseline	Intraischämisch	Reperfusion
keine Infusion	99,08 ± 7,39	92,27 ± 16,91	89,1 ± 12,99	335 ± 38,31	389,09 ± 59,03	357,7 ± 64,24	36,69 ± 0,41	36,94 ± 0,08	36,82 ± 0,22
AI 4°C	104 ± 7,13	89,63 ± 9,29	88,63 ± 8,25	368,17 ± 29,6	388 ± 49,83	351,88 ± 28,84	36,75 ± 0,45	36,87 ± 0,07	36,74 ± 0,22
AI 23°C	92,75 ± 8,07	90,89 ± 5,71	82,5 ± 10,15	339,75 ± 35,94	381,33 ± 32,64	367,6 ± 35,3	36,72 ± 0,39	36,91 ± 0,05	36,68 ± 0,25
AI 37°C	91,5 ± 7,84	96,1 ± 17,69	89,27 ± 15,93	346,83 ± 30,3	399,1 ± 42,28	373 ± 25,95	36,45 ± 0,22	36,9 ± 0,09	36,8 ± 0,14

Tab. 9: Ausgewählte Vitalparameter abhängig der Anwendung von AI und der Infusionstemperatur
n(keine Infusion) = 12; n(AI 4°C) = 9; n(AI 23°C, AI 37°C) = 12

4. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen, dass die untersuchten Post-Reperfusionen intra-arterielle Infusionen (AI) Einfluss auf die Entwicklung des Infarktolumens nach MCAO haben. Bei Monotherapie mit AI konnte ein maximaler neuroprotektiver Effekt von 75% erzielt werden. Dieser Effekt übertrifft die in bisherigen Publikationen zu Post-Reperfusionen AI gezeigten maximalen Effektgrößen.^{110,116}

Bei Verwendung von Raumluft als Atemgas ist dieser protektive Effekt temperaturabhängig und bei körperwarmen Infusionen (37°C) am stärksten ausgeprägt. Die durch Behandlung mit normobarer Hyperoxygenierung erzielte Neuroprotektion scheint durch zusätzliche Anwendung von Post-Reperfusionen AI gesteigert zu werden, wobei dieser Mehr-Effekt keine statistische Signifikanz erreichte. Bei kombinierter Therapie hatte die Temperatur der Infusion in unserem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf das Infarktolumen.

4.1. Gewähltes Operationsmodell

Um die Effekte von Post-Reperfusionen AI hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit möglichst realistisch darstellen zu können, verwendeten wir in unseren Experimenten ein neuartiges experimentelles Modell. In den beiden bisherigen Veröffentlichungen zu Post-Reperfusionen AI kam, wie auch in unseren Versuchen, ein Rattenmodell zum Einsatz. Es wurde nach Wiederherstellung der Reperfusion ein PE-50 Katheter 5mm in die ipsilaterale A. carotis interna eingeführt durch den die Applikation der Infusion erfolgte.^{110,116} Durch das Einführen eines solchen Katheters kommt es zu einem weitestgehenden Verschluss der Arterie. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Blutversorgung des ipsilateralen Stromgebietes der A. cerebri interna über Kollateralflüsse auf der Ebene des Circulus willisi aufrechterhalten wurde. Dieser ist bei der Ratte üblicherweise gut ausgebildet: Das Abklemmen der A. carotis interna führt im ipsilateralen Mediastromgebiet lediglich zu einer Reduktion des LDF Messwertes um 10%.¹⁵²

Während der Applikation von AI in die verschlossene A. carotis interna ist jedoch davon auszugehen, dass es zu Veränderungen in den Druckverhältnissen auf Ebene des Circulus willisi kommt. Ob und in welchem Ausmaß diese lokalen Druckänderungen zu

einer Reduktion bzw. einer Aufhebung der Kollateralflüsse führen ist nicht bekannt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass in den bisherigen Studien aufgrund des verwendeten Operationsmodells während der Infusionsperiode keine suffizienten Kollateralflüsse bestanden, und somit nur eine unzureichende Simulation von Post-Reperfusion-Verhältnissen möglich war.

Um diese Limitation auszugleichen verwendeten wir in unseren Experimenten erstmals ein tierexperimentelles Modell, in dem Post-Reperfusion AI unter physiologischen Flussverhältnissen im Stromgebiet der ipsilateralen A. carotis interna untersucht werden konnten. Wir führten den Infusionskatheter über den Stumpf der ligierten A. carotis externa ein und fixierten die Spitze des Katheters auf Höhe der Carotisbifurkation. Der Blutfluss von der A. carotis communis in die A. carotis interna wurde durch die Platzierung des Katheters nicht beeinträchtigt. Während der Applikation von AI kam es zu einer Durchmischung von vorbeiströmendem Blut und infundierter Kochsalzlösung im Bereich der Katheterspitze. Durch die Aufrechterhaltung physiologischer Flussverhältnisse im Stromgebiet der A. carotis, erreichte unser Operationsmodell eine größtmögliche Annäherung an die klinischen Verhältnisse nach einer endovaskulären Rekanalisation. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem in bisherigen Studien verwendeten Operationsmodell dar und optimiert die klinische Übertragbarkeit der erhobenen Ergebnisse. Die Durchführung des operativen Modells erwies sich in unseren Versuchen als gut möglich und war mit einer geringen perioperativen Komplikationsrate (7,5%) verbunden.

4.2. Einfluss des verwendeten Atemgases auf die arteriellen Blutgase

In der Kontrollgruppe (G1) und den Gruppen die einer Monotherapie mit AI unterzogen wurden (G2-4) verwendeten wir in unseren Versuchen Raumluft (79% N₂, 21% O₂) als Atemgas während der experimentellen Eingriffe. Dieses Vorgehen wurde gewählt um die Effekte der NBO Therapie deutlicher darstellen zu können und ist in der Literatur in Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung von Hyperoxygenierung mehrfach vorgeschrieben.^{127,153} In den mit Raumluft beatmeten Versuchsgruppen kam es während der Eingriffe narkosebedingt zu einem Absinken der durchschnittlichen arteriellen Sauerstoffkonzentration auf Werte im niedrigen physiologischen Bereich (64,2 ± 10,5

mmHg). Diese Beobachtung unterschied sich nicht relevant von den Ergebnissen anderer Untersuchungen.^{127,153}

Die Verwendung von NBO (100% Sauerstoff) in den Gruppen G5-8 führte erwartungsgemäß zu einer hochsignifikanten Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut auf durchschnittlich $434,7 \pm 62,7$ mmHg. Der beobachtete Anstieg der arteriellen Kohlendioxidkonzentration in den NBO Gruppen kann wahrscheinlich durch Sauerstoff-induzierte leichte Hypoventilation erklärt werden.¹²⁷

4.3. Therapieeffekte von AI

4.3.1. Neuroprotektion durch körperwarme AI

In unserem Versuchsaufbau wirkten körperwarme (37°C) intra-arterielle Infusionen neuroprotektiv und reduzierten das Infarktvolumen nach 100min MCAO sowohl bei Verwendung von Raumluft als Atemgas als auch bei NBO Therapie um 75% bzw. 81% (jeweils $p < 0,001$). Diese eindrücklichen Wirkeffekte übertreffen die bisher in der Literatur veröffentlichten Daten, in denen durch Post-Reperfusion AI eine maximale Reduktion des Infarkt Volumens um 40% gezeigt werden konnte.^{110,116}

Die Mechanismen die bei körperwarmen AI zu Neuroprotektion führen sind bisher nicht ausreichend verstanden. In unserem Experiment kam es durch die Applikation von AI zu einer hochsignifikanten Reduktion des während der Infusionsphase gemessenen Hämatokrit im Vergleich zu Gruppen ohne Infusion ($31,5 \pm 4,5$ vs. $38,4 \pm 4,8$; $p < 0,001$). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Berichten aus anderen Experimenten, in denen bei Anwendung von intra-arteriellen Infusionen ebenfalls verminderte Hämatokrit-Werte beobachtet wurden, wobei die Unterschiede in keiner dieser Untersuchungen statistische Signifikanz erreichten.^{105,111,115} In einem dieser Experimente wurden AI mit der i.v. Applikation eines identischen Flüssigkeitsvolumens verglichen. Obwohl beide Infusionsarten ähnliche Auswirkungen auf den systemischen Hämatokrit hatten, zeigte die i.v. Applikation im Gegensatz zur intra-arteriellen Gabe keine neuroprotektive Wirksamkeit.¹⁰⁵ Daten aus einem Hundexperiment weisen sogar darauf hin, dass ein forciertes Absenken des systemischen Hämatokrit auf 32-34% durch i.v. Gabe von kristalloiden Lösungen zu signifikant größeren Infarkt volumina führt.¹⁵⁴

Möglicherweise relevanter als die infusionsbedingte systemische Hämodilution ist die lokale Verminderung des Hämatokrit im Stromgebiet der betreffenden Arterie während der Applikation von AI. Das Ausmaß der lokalen Hämodilution wurde noch nie experimentell quantifiziert. Verfügbar sind lediglich die Ergebnisse von Berechnungen die auf Computersimulationen zum Einsatz von AI beim Menschen beruhen. Neimark et al. berechneten, dass eine Infusion von 30ml/min für 60 Minuten (Totalvolumen: 1,8 Liter) einen Abfall des lokalen Hämatokrit-Wertes von 42 auf 31 bewirken würde.⁹⁹ Eine Erhöhung der Infusionsrate auf 50ml/min (Totalvolumen: 3 Liter) würde dieses Absinken verstärken, und zu lokalen Werten von 26,5 führen.⁹⁶

Es wäre denkbar, dass die durch AI verursachte lokale Hämodilution zu einem vermehrten Ausspülen von Mikrothromben und proinflammatorischen Metaboliten führt. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wurde auch beim *Pre-Reperfusion Flushing*, also der Spülung des Infarktareals vor Einsetzen der Reperfusion, postuliert.¹⁰⁶ In Tierexperimenten konnte durch *Pre-Reperfusion Flushing* unabhängig von der Infusionstemperatur eine Verringerung des Infarktolumens um ca. 65% erzielt werden.¹⁰⁵ Untersuchungen zeigten, dass *Pre-Reperfusion Flushing* auch zu einer Suppression der lokalen Entzündungsreaktion und einer Verbesserung der Mikrozirkulation führt.^{105,107} Eine signifikante Ödemreduktion und verminderte MMP-2 und MMP-9 Expression in der Akutphase deuten auf einen stabilisierenden Effekt auf die Blut-Hirn Schranke hin.¹⁰⁸

Allerdings unterscheidet sich *Pre-Reperfusion Flushing* in einigen wesentlichen Punkten von den in unseren Experimenten angewendeten Post-Reperfusion AI. Beim *Pre-Reperfusion Flushing* erfolgt die Flüssigkeitsapplikation vor Wiedereinsetzen der Reperfusion und mit bis zu 10-fach höheren Infusionsraten als in unseren Experimenten (2-3ml/min vs. 0,3ml/min).¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Die hohe Infusionsrate scheint dabei für die Neuroprotektion von essentieller Bedeutung zu sein. Die Applikation eines identischen Infusionsvolumens (6ml) mit einer verminderten Infusionsrate von 0,6ml/min vor Wiederherstellung der Blutversorgung führte zu einem Verlust der neuroprotektiven Wirkung von 37°C warmer Infusion hinsichtlich des Infarktolumens¹¹⁵, sowie der Entzündungsreaktion im ischämischen Areal.¹¹⁴

4.3.2. Temperaturabhängigkeit der neuroprotektiven Effekte von AI

In unserem Modell zeigte die durch eine Monotherapie mit AI hervorgerufene Neuroprotektion eine starke Temperaturabhängigkeit. Maximale Protektion konnte durch die Infusion körperwarmer (37°C) physiologischer Kochsalzlösung erreicht werden. Anders als in bisherigen Untersuchungen^{110,112,115,116} führte in unserem Versuchsaufbau eine Reduktion der Infusionstemperatur nicht zu einer Wirkungsverstärkung. Vielmehr kam es bei Infusionstemperaturen unterhalb der Körpertemperatur (4°C oder 23°C) zu einem Verlust der neuroprotektiven Effekte. Diese Beobachtung steht insbesondere im Gegensatz zu den wenigen bisher zu Post-Reperfusion AI veröffentlichten Daten, in denen jeweils eine stärkere Wirksamkeit von 10°C kalter AI gegenüber körperwarmer Infusionen beschrieben wurde.^{110,116}

Der beobachtete Verlust der neuroprotektiven Effekte bei hypothermen Infusionstemperaturen kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in unseren Experimenten erstmals die Anwendung von AI bei verknüpftem Sauerstoffangebot untersucht wurde: Im Gegensatz zu anderen AI Studien, in denen die Beatmung mit einem Sauerstoffanteil 30 % O₂ durchgeführt wurde^{105-109,111,115}, verwendeten wir Raumluft (21% O₂) als Atemgas. Dies führte in den Versuchsgruppen ohne NBO in Kombination mit der atemdepressiven Wirkung der Narkose zu einem Absinken der mittleren arteriellen Sauerstoffkonzentration in den niedrigen physiologischen Bereich (64,2 ± 10,5 mmHg).

Mehrere Experimente deuten darauf hin, dass eine ausreichende Sauerstoffversorgung während therapeutischer Hypothermie von großer Wichtigkeit ist. Hypothermie führt zu einer erhöhten Sauerstoffaffinität von Hämoglobin.¹⁴⁵ Beim Menschen konnte ein Abfall der zu einer Hämoglobinsättigung von 50% führenden Sauerstoffkonzentration (P₅₀ Wert) von 29 mmHg bei normothermen Temperaturen auf 23,9 mmHg bei 35,5°C und 11,6 mmHg bei 25,5°C Körpertemperatur beobachtet werden.^{155,156} Oda et al. zeigten in einem Tiermodell, dass dieser Effekt den Übertritt von Hämoglobin-gebundenem Sauerstoff in das Gewebe erschwert. Dies ist wahrscheinlich bei ausreichender Sauerstoffversorgung von geringer Bedeutung, da es durch Hypothermie gleichzeitig zu einer Hemmung des zellulären Metabolismus und einem reduzierten Sauerstoffbedarf kommt. In Situationen von begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit, wie das

in unserem Experiment in den mit Raumluft beatmeten Gruppen der Fall war, erhöht sich durch den erschwerten Übertritt von Sauerstoff aus dem Blut allerdings das Risiko einer potentiell schädlichen Gewebehypoxie.¹⁵⁷

Durch die Anwendung von kalten AI zur Hypothermieinduktion wird dieses Risiko wahrscheinlich zusätzlich erhöht. Im Unterschied zu anderen Kühlmethoden führen kalte AI zu einer fokussierten Temperaturminderung des hirnversorgenden Blutes, das bei dieser Kühlmethode als Übertragungsmedium der Kühlwirkung fungiert. Insbesondere bei Verwendung von 4°C kalten AI ist deshalb von tief hypothermen Temperaturen im Blut des nachgeschalteten Stromgebiets auszugehen. Dies resultierte wahrscheinlich in einem besonders erschwerten Übertritt von Sauerstoff ins Gewebe.

Darüber hinaus kommt es bei AI durch Hämodilution zu einer Senkung der Gesamt-Sauerstoffkonzentration in Blut. Die von uns demonstrierte neuroprotektive Wirkung von körperwarmen AI weist darauf hin, dass diese Hämodilution an sich auch bei limitiertem Sauerstoffangebot keine schädliche Wirkung hat. Bei Applikation von kalten AI könnte jedoch lokale Hemodilution in Kombination mit der Hypothermiebedingten verstärkten Hämoglobin-Sauerstoffbindung zur Entwicklung von Gewebehypoxie beigetragen haben, und damit die fehlende protektive Wirkung von kalten AI mit 23°C und 4°C bei Beatmung mit Raumluft erklären. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Applikation von kalten AI in Kombination mit Hyperoxygenierung in unseren Versuchen nicht zu einem Verlust der neuroprotektiven Wirkung führte. Beatmung mit NBO führte zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Blut und kompensierte so vermutlich die durch kalte AI bedingte Hämodilution und verstärkte Hämoglobin-Sauerstoff Bindung.

Wahrscheinlich sind bereits Sauerstoffkonzentrationen im hohen physiologischen Bereich ausreichend um das Risiko von Gewebehypoxie bei Applikation von kalten AI zu vermeiden. In bisherigen AI Experimenten wurde die Beatmung während der Narkose zumeist mit einem Gemisch von 70 % Distickstoffmonoxid (N₂O) und 30 % O₂ durchgeführt.^{105-109,111,115} In allen Publikationen die arterielle Sauerstoffkonzentration berichteten, wurden Konzentrationen im hohen physiologischen Bereich von 100 bis 130mmHg gemessen.^{109-111,116} Die geringsten in einer Versuchsgruppe gemessenen Durchschnittskonzentrationen betragen nach der

Beendigung der Infusion bei 88mmHg.¹¹⁶ Unter diesen Bedingungen verstärkte ein Absenken der Infusionstemperatur jeweils die neuroprotektive Wirkung.^{109-111,116}

4.4. Therapieeffekte von NBO

Eine Monotherapie mit NBO führte in unserem Versuchsmodell nach 100min MCAO zu einer durchschnittlichen Reduktion des mittleren Infarkt volumens um 61% gegenüber der mit Raumluft beatmeten Kontrollgruppe. Diese Reduktion entspricht der Effektgröße die auch in anderen NBO Experimenten gezeigt werden konnte. In einem MCAO-Modell mit einer Dauer von 120 Minuten von Singhal et al. bewirkte NBO mit einem Behandlungsstart 15 Minuten nach Ischämieinduktion eine Verminderung des Infarkt volumens um 67%.¹²⁶ Eine etwas geringere neuroprotektive Wirkung von 40% konnte in einem anderen Experiment mit einer Ischämiedauer von 90 Minuten gezeigt werden.¹²⁰

Ein wesentlicher Grund für den relativ starken Effekt der Hyperoxygenierung in unseren Experiment war vermutlich neben der Verwendung von Raumluft als Atemgas in der Kontrollgruppe die kontinuierliche Applikation von 100% Sauerstoff während des gesamten operativen Eingriffs in den NBO-Gruppen. Die Ergebnisse anderer Tierstudien legen nahe, dass sich der Effekt von NBO durch einen früheren Therapiebeginn und eine längere Anwendungsdauer verstärkt.¹²⁶

4.5. Therapieeffekte der Kombinationstherapie

Unsere Experimente untersuchten erstmals eine kombinierte Therapie mit intra-arteriellen Infusionen und NBO beim akuten Schlaganfall. Die Idee, intra-arterielle Infusionen mit anderen Neuroprotektiva zu kombinieren, wurde erstmals von Slotboom et al. formuliert.¹⁰⁰ Zwei tierexperimentelle Studien untersuchten die Kombination kalter AI mit anderen neuroprotektiven Substanzen. Song et al. versetzten physiologische Kochsalzlösung (15°C) mit Magnesiumsulfat, einem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor Antagonisten der Zellschäden durch Exzitotoxizität vermindern soll. Dabei zeigte sich bei Anwendung der mit Magnesium versetzten Infusionen 17% kleinere Infarkte und ein besseres funktionelles Outcome als bei Anwendung von physiologischer Kochsalzlösung.¹¹¹ Chen et al. infundierten eine

niedrigdosierte Albuminlösung, die unter anderem zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation führen sollte.¹⁵⁸ Die intra-arterielle Applikation kalter Albuminlösung (0°C) wirkte dabei wesentlich stärker neuroprotektiv als kalte (0°C) physiologische Kochsalzlösung oder warme (37°C) Albuminlösung.¹¹² Jedoch muss einschränkend festgestellt werden, dass für beide Substanzen als Monotherapie bereits Ergebnisse großer klinischer Studien vorliegen, in denen die im Tierexperiment gezeigten neuroprotektiven Effekte nicht bestätigt werden konnten.^{159,160} Klinische Untersuchungen zur Kombinationstherapie mit AI stehen für beide Substanzen bislang aus.

4.5.1. Neuroprotektive Wirksamkeit

Eine kombinierte Therapie mit intra-arteriellen Infusionen und Hyperoxygenierung (G6-8) zeigte in unserem Versuchsmodell unabhängig von der Temperatur der intra-arteriellen Infusion eine hochsignifikante Reduktion des Infarktolumens nach 24 Stunden um durchschnittlich 74% gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Obwohl bei Kombinationstherapie in allen Gruppen kleinere mittlere Infarktolumina als bei Monotherapie mit NBO beobachtet wurden (G6: $94,3 \pm 26,8 \text{ mm}^3$; G7: $95,8 \pm 57,1 \text{ mm}^3$; G8: $62,9 \pm 33,8 \text{ mm}^3$ vs. G5: $127,8 \pm 38,2 \text{ mm}^3$) erreichte dieser Mehr-Effekt keine statistische Signifikanz. Allerdings führte in unserem Versuchsmodell bereits die Monotherapie mit NBO zu einer so ausgeprägten Reduktion des Infarktolumens (-61%), dass die Beurteilung eines relevanten Zusatzeffektes der Kombinationstherapie nur eingeschränkt möglich war.

Die bisherige Datenlage zur Kombinationstherapie mit Hypothermie und Hyperoxygenierung ist äußerst gering. Insgesamt finden sich in der Literatur nur drei Tierstudien^{146,161,162} und ein Fallbericht¹⁶³ in denen Ganzkörperkühlung und HBO kombiniert wurden. Eine Kombination von lokaler Hirnkühlung und NBO wurde noch nie untersucht. In einer Studie von Wada et al. wurde die sequentielle Anwendung von Ganzkörperkühlung (31°C) und HBO in einem globalen Ischämie-Modell an der Rennmaus untersucht. Hier zeigte sich, dass Hyperoxygenierung in der Erwärmungsphase nach 1-stündiger therapeutischer Hypothermie zu einer signifikanten zusätzlichen protektiven Wirkung führt.¹⁴⁶ Patterson et al. zeigten 1968, dass Ganzkörperkühlung kombiniert mit HBO positive Einflüsse in einem globalen

Ischämiemodell am Hund hat. In diesem Modell war eine Monotherapie mit tiefer Hypothermie (28°C) bereits mit einer deutlichen Erhöhung der Ischämietoleranz von 6 auf 30 Minuten verbunden. Die additive Therapie mit HBO erweiterte dieses Zeitfenster auf 35 Minuten, ein Ergebnis das sich jedoch nicht signifikant gegenüber einer Monotherapie mit Hypothermie unterschied.¹⁶¹ Topuz et al. untersuchten den additiven Effekt einer simultanen Therapie mit Ganzkörperkühlung (27-29°C) und HBO in einem Modell von traumatischer Rückenmarksschädigung. Auch hier konnte ein nicht-signifikanter Trend hin zu besserem funktionellen Outcome bei Kombinationstherapie gezeigt werden.¹⁶² In dem genannten Fallbericht wurde ein Patient nach Intoxikation mit Schwefelwasserstoff (H₂S) und Herzstillstand einer sequentiellen Behandlung mit HBO für 2 Stunden gefolgt von Ganzkörperkühlung (32-34°C) unterzogen. Diese Therapie wurde von dem Patienten ohne relevante Komplikationen vertragen und es kam zu einer guten Erholung mit nur geringen residuellen Defiziten.¹⁶³

4.5.2. Sicherheitsaspekte

Sicherheitsbedenken hinsichtlich der kombinierten Anwendung von körperwarmen oder kalten AI und Hyperoxygenierung ergaben sich in unseren Experimenten nicht. Die Anwendung der Kombinationstherapie führte bei allen getesteten Infusionstemperaturen im Vergleich zur Monotherapie mit NBO zu einer Verkleinerung des mittleren Infarktolumens (siehe Abbildung 5). Zudem kam es bei kombinierter Anwendung von AI und NBO im Gegensatz zur AI-Monotherapie zu einem Erhalt der neuroprotektiven Wirksamkeit bei Infusionstemperaturen unterhalb der Körpertemperatur (siehe Abschnitt 4.3.2).

Die Ergebnisse einer Studie von Zinchuk et al. lieferten Hinweise darauf, dass es bei tiefer Hypothermie (24°C) zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation in verschiedenen Organen (Lunge, Niere, Herz, Leber) kommt. Die Autoren der Studie argumentieren, dass es durch die erhöhte Hämoglobin-Sauerstoffaffinität bei hypothermen Temperaturen zu einer Beeinträchtigung der anti-oxidativen Schutzmechanismen kommt.¹⁶⁴ Eine Erhöhung des oxidativen Stresses wurde auch als potentiell Risiko bei Hyperoxygenierung diskutiert.¹¹⁹ Auch wenn das Ausmaß der oxidativen Zellschädigung in unseren Experimenten nicht quantifiziert wurde, geben unsere Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass eine kombinierte Anwendung von lokaler

Hypothermie und Hyperoxygenierung durch NBO zu einer relevanten Hirnschädigung führt.

4.6. Limitationen der Studie

Die durchgeführten Experimente weisen mehrere Limitationen auf. Es muss davon ausgegangen werden, dass in unserem Versuchsaufbau die Möglichkeit einen relevanten Zusatznutzen der Kombinationstherapie im Vergleich zur AI- und NBO-Monotherapie zu detektieren durch die verwendete Ischämiedauer von 100 Minuten limitiert wurde. Bereits eine Monotherapie mit körperwarmen (37°C) AI oder NBO führte zu einer äußerst effektiven Behandlung des ausgelösten Hirnschadens und reduzierte das Infarktvolume von $324,8 \pm 129,5 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe auf $82,7 \pm 37,2 \text{ mm}^3$ (37°C AI) bzw. $127,8 \pm 38,2 \text{ mm}^3$ (NBO). Retrospektiv muss davon ausgegangen werden, dass der Nachweis eines darüber hinaus gehenden, relevanten Zusatznutzens der Kombinationstherapie nur bei einer verlängerten Ischämiedauer von mehr als 100 Minuten möglich wäre.

Ein Grund für die vergleichsweise starke Wirksamkeit von NBO war die Verwendung von Raumluft als Atemgas in allen Gruppen ohne NBO. Jedoch lieferte die Verwendung von Raumluft einen wichtigen Hinweis auf die möglichen Risiken von kalten AI. Die durch das Atmen von Raumluft bedingten Sauerstoffkonzentrationen im grenzwertigen physiologischen Bereich sind wahrscheinlich Ursache des in dieser Untersuchung erstmals beobachteten Verlusts von Neuroprotektion bei Infusionstemperaturen unterhalb der Körpertemperatur. Um diese These zu belegen, sind weitere Untersuchungen mit einem leicht erhöhtem Sauerstoffangebot im Atemgas notwendig (z.B. 30% O₂ 70% N₂).

Zudem erlauben die Ergebnisse unserer Experimente keine Beurteilung der möglichen Effekte einer kombinierten Therapie mit Hyperoxygenierung und Ganzkörperkühlung, dem derzeitigen Goldstandard bei therapeutischer Hypothermie. Es ist vielmehr anzunehmen, dass in unseren Experimenten sowohl die verwendete selektive Hirnkühlung als auch die gewählte Kühlmodalität (AI) einen wichtigen Einfluss auf das erzielte neuroprotektive Ergebnis hatte. Auch diese Hypothese muss durch weitere Experimente geprüft werden.

In der statistischen Analyse unserer Versuche zeigte sich kein signifikanter Effekt der gesetzten Interventionen hinsichtlich des funktionellen Outcome. Die Erhebung der Testergebnisse erfolgte nach 24 Stunden, einem Zeitpunkt der auch bei anderen Versuchen zu Hypothermie und Hyperoxygenierung gewählt wurde.^{41,127} Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass eine spätere Testung der Versuchstiere unsere Ergebnisse beeinflusst hätte. Eine Studie zeigte, dass der Einfluss von Post-Reperfusion AI auf das funktionelle Outcome nach 48 Stunden wesentlich deutlicher ausgeprägt war als nach 24 Stunden.¹¹⁶

4.7. Klinische Relevanz der Ergebnisse

Unsere Studie liefert wichtige Hinweise für eine zukünftige klinische Anwendung von AI: Das neuartige Operationsmodell erlaubte erstmals die Applikation von intra-arteriellen Infusionen, ohne dass dadurch der physiologische Blutfluss im Stromgebiet der ipsilateralen A. carotis interna eingeschränkt wurde. Die erhobenen Resultate unterstützen die Ergebnisse bisheriger Experimente in denen die neuroprotektive Wirkung von intra-arteriellen Infusionen gezeigt wurde.^{105,115,116}

Es zeigte sich jedoch, dass bei verknappter Sauerstoffversorgung der neuroprotektive Effekt von Post-Reperfusion AI bei Verwendung von gekühlten Infusionen (4°C oder 23°C) verloren geht. Hyperoxygenierung mit NBO korrigierte diesen Effekt und führte zu starken neuroprotektiven Effekten unabhängig von der gewählten Infusionstemperatur. In Zusammenschau mit den bisher veröffentlichten Ergebnissen¹⁰⁹⁻¹¹¹ verdeutlicht dies die Wichtigkeit einer ausreichenden Oxygenierung während kalter intra-arterieller Infusionen.

5. Zusammenfassung

Hintergrund Neuroprotektive Therapieoptionen stehen beim ischämischen Schlaganfall derzeit nur für eine Minderheit der Betroffenen zur Verfügung. Hypothermie und Hyperoxygenierung sind vielversprechende alternative Therapieansätze zur multimodalen Induktion von Neuroprotektion. Die klinische Anwendung von therapeutischer Hypothermie mit den derzeit verfügbaren Ganzkörperkühlmethoden wird jedoch durch beträchtliche Nebenwirkungen eingeschränkt. Eine selektive Kühlung des Gehirns könnte diese Nebenwirkungen umgehen.

Die vorliegende Dissertationsschrift untersucht (1) die neuroprotektive Effektivität selektiver Hirnkühlung durch intra-arterielle Infusionen und (2) erstmals in einem Schlaganfallmodell, ob die Kombination von Hypothermie und Hyperoxygenierung synergistische neuroprotektive Effekte bewirkt.

Methoden In einem neuartigen tierexperimentellen Modell wurde an Ratten durch transiente Okklusion der A. cerebri media ein Schlaganfall induziert. In den Versuchsgruppen erfolgte nach Wiederherstellung der Blutversorgung die intra-arterielle Infusion (AI) physiologischer Kochsalzlösung mit einer Temperatur von 4°C, 23°C oder 37°C in die ipsilaterale A. carotis interna. Die Auswirkungen der Intervention wurden sowohl bei Beatmung mit Raumluft (21% O₂) als auch bei Kombinationstherapie mit normobarer Hyperoxygenierung (NBO; 100% O₂) untersucht.

Ergebnisse Bei Beatmung mit Raumluft kam es zu arteriellen Sauerstoffkonzentrationen im niedrigen physiologischen Bereich ($64,2 \pm 10,5$ mmHg), die durch NBO hochsignifikant gesteigert wurden ($434,7 \pm 62,7$ mmHg, $p < 0,001$).

Körperwarme (37°C) AI führten bei Beatmung mit Raumluft zu einer hochsignifikanten Reduktion des Infarkt Volumens um 75% im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Bei hypothermen Infusionstemperaturen (23°C oder 4°C) kam es unter diesen Bedingungen zu einem Verlust der neuroprotektiven Wirkung. Eine Monotherapie mit 4°C führte zudem zu einer erhöhten Mortalität (42,9%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (21,1%) und den anderen Therapiegruppen (0-10,0%).

Eine Kombinationstherapie mit AI und NBO hatte unabhängig von der Infusionstemperatur neuroprotektive Effekte auf das Infarktvolumen (-70 bis -90%,

jeweils $p < 0,001$). Die Kombinationstherapie führte dabei in allen Versuchsgruppen zu einer stärkeren Reduktion des Infarktvolumens als eine Monotherapie mit NBO (-61%, $p < 0,001$) wobei dieser Mehr-Effekt keine statistische Signifikanz erreichte. Signifikante Auswirkungen auf die Ödembildung und das funktionelles Outcome fanden sich in keiner der Versuchsgruppen.

Diskussion Die dargestellten Versuchsergebnisse zeigen erstmals, dass es bei arteriellen Sauerstoffkonzentrationen im niedrigen physiologischen Bereich zu einem Verlust der neuroprotektiven Eigenschaften von hypothermen AI kommt. Ursache dafür ist wahrscheinlich das Auftreten von Gewebhypoxie durch lokale Hämodilution und eine Hypothermie-bedingte Verstärkung der Hämoglobin-Sauerstoff Bindung. Durch eine Kombinationstherapie mit AI und NBO konnte dieser Effekt kompensiert werden. Bei kombinierter Anwendung von AI und NBO wurden zudem, unabhängig von der Infusionstemperatur, nicht-signifikant kleinere Infarktvolumina beobachtet als bei Monotherapie mit NBO. Zur besseren Differenzierung der beobachteten Effekte sind weitere Experimente mit leicht erhöhter Sauerstoffzufuhr und mit verlängerter Ischämiezeit notwendig.

6. Literaturverzeichnis

1. Heuschmann P, Busse O, Wagner M, et al. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 2010;37:333-40.
2. Busch M, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Gößwald A. Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2013;56:656-60.
3. Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T, Hesse Stroke Study G. The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050. *Deutsches Arzteblatt international* 2008;105:467-73.
4. Boysen G, Marott JL, Gronbaek M, Hassanpour H, Truelsen T. Long-term survival after stroke: 30 years of follow-up in a cohort, the Copenhagen City Heart Study. *Neuroepidemiology* 2009;33:254-60.
5. Lozano R, Ortblad KF, Lopez AD, Murray CJ. Mortality from HIV in the Global Burden of Disease study - authors' reply. *Lancet* 2013;381:991-2.
6. Patel MD, Tilling K, Lawrence E, Rudd AG, Wolfe CD, McKeivitt C. Relationships between long-term stroke disability, handicap and health-related quality of life. *Age and ageing* 2006;35:273-9.
7. Murray CJ, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2197-223.
8. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2006;37:1179-83.
9. WHO. Cerebrovascular disorders: a clinical and research classification. Geneva: World Health Organization; 1978.
10. Sudlow CL, Warlow CP. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. *International Stroke Incidence Collaboration. Stroke; a journal of cerebral circulation* 1997;28:491-9.
11. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke; a journal of cerebral circulation* 1993;24:35-41.
12. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371:1612-23.
13. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 2008;359:1317-29.
14. Dirks M, Niessen LW, van Wijngaarden JD, et al. Promoting thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011;42:1325-30.
15. Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1994;25:1658-64; discussion 64-5.
16. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1997;17:1048-56.

17. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 1999;22:391-7.
18. O'collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006;59:467-77.
19. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1981;12:723-5.
20. Heiss WD, Graf R, Wienhard K, et al. Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1994;14:892-902.
21. Fisher M, Garcia JH. Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 1996;47:884-8.
22. van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *Plos Med* 2010;7.
23. Rogalewski A, Schneider A, Ringelstein EB, Schabitz WR. Toward a multimodal neuroprotective treatment of stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2006;37:1129-36.
24. Savitz SI, Fisher M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann Neurol* 2007;61:396-402.
25. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet* 2008;371:1955-69.
26. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine* 2002;346:557-63.
27. Hypothermia after Cardiac Arrest Study G. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *The New England journal of medicine* 2002;346:549-56.
28. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, et al. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2011;165:692-700.
29. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010;122:S768-86.
30. Kattwinkel J, Perlman JM, Aziz K, et al. Part 15: neonatal resuscitation: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010;122:S909-19.
31. van der Worp HB, Sena ES, Donnan GA, Howells DW, Macleod MR. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Brain : a journal of neurology* 2007;130:3063-74.
32. Hagerdal M, Harp J, Nilsson L, Siesjo BK. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *Journal of neurochemistry* 1975;24:311-6.
33. Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007;27:1879-94.
34. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* 2009;37:S186-202.

35. Apostolakis E, Akinosoglou K. The methodologies of hypothermic circulatory arrest and of antegrade and retrograde cerebral perfusion for aortic arch surgery. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia* 2008;14:138-48.
36. McCullough JN, Zhang N, Reich DL, et al. Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *The Annals of thoracic surgery* 1999;67:1895-9; discussion 919-21.
37. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1987;7:729-38.
38. Zhao H, Steinberg G. Limited Therapeutic Time Windows of Mild-to-Moderate Hypothermia in a Focal Ischemia Model in Rat. *Stroke Res Treat* 2011;2011:131834.
39. Goto Y, Kassell NF, Hiramatsu K, Soleau SW, Lee KS. Effects of intraischemic hypothermia on cerebral damage in a model of reversible focal ischemia. *Neurosurgery* 1993;32:980-4; discussion 4-5.
40. Maier CM, Ahern KV, Cheng ML, Lee JF, Yenari MA, Steinberg GK. 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; a journal of cerebral circulation* 1998;29:2171-80.
41. Kollmar R, Blank T, Han JL, Georgiadis D, Schwab S. Different degrees of hypothermia after experimental stroke: short- and long-term outcome. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007;38:1585-9.
42. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine* 2009;37:1101-20.
43. Hemmen TM, Raman R, Guluma KZ, et al. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2010;41:2265-70.
44. Lopez M, Sessler DI, Walter K, Emerick T, Ozaki M. Rate and gender dependence of the sweating, vasoconstriction, and shivering thresholds in humans. *Anesthesiology* 1994;80:780-8.
45. Frank SM, Higgins MS, Fleisher LA, Sitzmann JV, Raff H, Breslow MJ. Adrenergic, respiratory, and cardiovascular effects of core cooling in humans. *The American journal of physiology* 1997;272:R557-62.
46. Sessler DI. Thermoregulatory defense mechanisms. *Critical care medicine* 2009;37:S203-10.
47. Kollmar R, Schellinger PD, Steigleder T, Kohrmann M, Schwab S. Ice-cold saline for the induction of mild hypothermia in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009;40:1907-9.
48. De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, et al. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): A feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 2004;63:312-7.
49. Horn CM, Sun CH, Nogueira RG, et al. Endovascular Reperfusion and Cooling in Cerebral Acute Ischemia (ReCLAIM I). *Journal of neurointerventional surgery* 2013.

50. Daniels SK, Brailey K, Priestly DH, Herrington LR, Weisberg LA, Foundas AL. Aspiration in patients with acute stroke. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 1998;79:14-9.
51. Aslanyan S, Weir CJ, Diener HC, et al. Pneumonia and urinary tract infection after acute ischaemic stroke: a tertiary analysis of the GAIN International trial. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2004;11:49-53.
52. Hilker R, Poetter C, Findeisen N, et al. Nosocomial pneumonia after acute stroke: implications for neurological intensive care medicine. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2003;34:975-81.
53. Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008;39:2910-7.
54. California Acute Stroke Pilot Registry I. Prioritizing interventions to improve rates of thrombolysis for ischemic stroke. *Neurology* 2005;64:654-9.
55. Yanamoto H, Hong SC, Soleau S, Kassell NF, Lee KS. Mild postischemic hypothermia limits cerebral injury following transient focal ischemia in rat neocortex. *Brain research* 1996;718:207-11.
56. Colbourne F, Corbett D, Zhao Z, Yang J, Buchan AM. Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000;20:1702-8.
57. Krieger DW, De Georgia MA, Abou-Chebl A, et al. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): An Open Pilot Study of Induced Hypothermia in Acute Ischemic Stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2001;32:1847-54.
58. Martin-Schild S, Hallevi H, Shaltoni H, et al. Combined neuroprotective modalities coupled with thrombolysis in acute ischemic stroke: a pilot study of caffeinol and mild hypothermia. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 2009;18:86-96.
59. Ovesen C, Brizzi M, Pott FC, et al. Feasibility of endovascular and surface cooling strategies in acute stroke. *Acta Neurol Scand* 2013;127:399-405.
60. Kammersgaard LP, Rasmussen BH, Jorgensen HS, Reith J, Weber U, Olsen TS. Feasibility and safety of inducing modest hypothermia in awake patients with acute stroke through surface cooling: A case-control study: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2000;31:2251-6.
61. Tomte O, Draegni T, Mangschau A, Jacobsen D, Auestad B, Sunde K. A comparison of intravascular and surface cooling techniques in comatose cardiac arrest survivors. *Critical care medicine* 2011;39:443-9.
62. Gillies MA, Pratt R, Whiteley C, Borg J, Beale RJ, Tibby SM. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: a retrospective comparison of surface and endovascular cooling techniques. *Resuscitation* 2010;81:1117-22.
63. Bernard S, Buist M, Monteiro O, Smith K. Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report. *Resuscitation* 2003;56:9-13.
64. Kim F, Olsufka M, Carlbom D, et al. Pilot study of rapid infusion of 2 L of 4 degrees C normal saline for induction of mild hypothermia in hospitalized, comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Circulation* 2005;112:715-9.

65. Kliegel A, Janata A, Wandaller C, et al. Cold infusions alone are effective for induction of therapeutic hypothermia but do not keep patients cool after cardiac arrest. *Resuscitation* 2007;73:46-53.
66. Polderman KH, Rijnsburger ER, Peerdeman SM, Girbes AR. Induction of hypothermia in patients with various types of neurologic injury with use of large volumes of ice-cold intravenous fluid. *Critical care medicine* 2005;33:2744-51.
67. Kollmar R, Gebhardt B, Schwab S. [EuroHYP-1 trial: EU-funded therapy study on the effectiveness of mild therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke]. *Der Nervenarzt* 2012;83:1252-9.
68. Hemmen TM, Rapp KS, Raman R, et al. Phase 2/3 study of intravenous thrombolysis and hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS 2/3). *Critical care* 2012;16:A13.
69. Zager RA, Altschuld R. Body temperature: an important determinant of severity of ischemic renal injury. *The American journal of physiology* 1986;251:F87-93.
70. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2002;282:G608-16.
71. Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovascular research* 2012;94:217-25.
72. Harris B, Andrews P. Direct Brain Cooling. In: S. M, Sessler D, eds. *Therapeutic Hypothermia*. New York: Marcel Dekker; 2005:323-86.
73. Mellergard P. Changes in human intracerebral temperature in response to different methods of brain cooling. *Neurosurgery* 1992;31:671-7; discussion 7.
74. Poli S, Purruicker J, Priglinger M, et al. Induction of cooling with a passive head and neck cooling device: effects on brain temperature after stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2013;44:708-13.
75. Wang H, Olivero W, Lanzino G, et al. Rapid and selective cerebral hypothermia achieved using a cooling helmet. *J Neurosurg* 2004;100:272-7.
76. Nelson DA, Nunneley SA. Brain temperature and limits on transcranial cooling in humans: quantitative modeling results. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 1998;78:353-9.
77. Keller E, Mudra R, Gugl C, Seule M, Mink S, Frohlich J. Theoretical evaluations of therapeutic systemic and local cerebral hypothermia. *Journal of neuroscience methods* 2009;178:345-9.
78. Sukstanskii AL, Yablonskiy DA. Theoretical limits on brain cooling by external head cooling devices. *European journal of applied physiology* 2007;101:41-9.
79. Andrews PJ, Harris B, Murray GD. Randomized controlled trial of effects of the airflow through the upper respiratory tract of intubated brain-injured patients on brain temperature and selective brain cooling. *British journal of anaesthesia* 2005;94:330-5.
80. Harris BA, Andrews PJ, Murray GD. Enhanced upper respiratory tract airflow and head fanning reduce brain temperature in brain-injured, mechanically ventilated patients: a randomized, crossover, factorial trial. *British journal of anaesthesia* 2007;98:93-9.
81. Covaciu L, Weis J, Bengtsson C, et al. Brain temperature in volunteers subjected to intranasal cooling. *Intensive care medicine* 2011;37:1277-84.
82. Springborg JB, Springborg KK, Romner B. First clinical experience with intranasal cooling for hyperthermia in brain-injured patients. *Neurocritical care* 2013;18:400-5.

83. Abou-Chebl A, Sung G, Barbut D, Torbey M. Local brain temperature reduction through intranasal cooling with the RhinoChill device: preliminary safety data in brain-injured patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011;42:2164-9.
84. Poli S, Purrucker J, Priglinger M, et al. RhinoChill for Rapid Induction of Cooling - A Safety Update. *Neurocritical care* 2013;[accepted for publication].
85. Poli S, Purrucker J, Priglinger M, et al. Safety Evaluation of Nasopharyngeal Cooling (RhinoChill®) in Stroke Patients: An Observational Study. *Neurocritical care* 2013:1-8.
86. Kim JH, Seo M, Han HS, Park J, Suk K. The neurovascular protection afforded by delayed local hypothermia after transient middle cerebral artery occlusion. *Current neurovascular research* 2013;10:134-43.
87. Clark DL, Colbourne F. A simple method to induce focal brain hypothermia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007;27:115-22.
88. Moomiaie RM, Gould G, Solomon D, et al. Novel intracranial brain cooling catheter to mitigate brain injuries. *Journal of neurointerventional surgery* 2012;4:130-3.
89. Bell RD, Powers BL, Brock D, et al. Ventriculo-lumbar perfusion in acute ischemic stroke. *Neurocritical care* 2006;5:21-9.
90. Choi JH, Bateman BT, Mangla S, et al. Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2006;37:419-24.
91. Selker RG, Wolfson SK, Maroon JC, Steichen FM. Preferential cerebral hypothermia with elective cardiac arrest: resection of "giant" aneurysm. *Surgical neurology* 1976:173-9.
92. Wolfson SK, Jr., Selker RG. Carotid perfusion hypothermia for brain surgery using cardiac arrest without bypass. *The Journal of surgical research* 1973;14:449-58.
93. Bachet J, Guilmet D. Brain protection during surgery of the aortic arch. *Journal of cardiac surgery* 2002;17:115-24.
94. Takano H, Sakakibara T, Matsuwaka R, Hori T, Sakagoshi N, Shinohara N. The safety and usefulness of cool head-warm body perfusion in aortic surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2000;18:262-9.
95. Matsuwaka R, Sakakibara T, Hori T, Shinohara N. Initial experience with cool head, warm body perfusion in aortic arch surgery. *Journal of cardiac surgery* 1998;13:463-7.
96. Konstas AA, Neimark MA, Laine AF, Pile-Spellman J. A theoretical model of selective cooling using intracarotid cold saline infusion in the human brain. *Journal of applied physiology* 2007;102:1329-40.
97. Neimark MA, Konstas AA, Choi JH, Laine AF, Pile-Spellman J. Local control of temperature in a theoretical human model of selective brain cooling. *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference* 2007;2007:6349-52.
98. Neimark MA, Konstas AA, Choi JH, Laine AF, Pile-Spellman J. Brain cooling maintenance with cooling cap following induction with intracarotid cold saline infusion: a quantitative model. *Journal of theoretical biology* 2008;253:333-44.
99. Neimark MA, Konstas AA, Laine AF, Pile-Spellman J. Integration of jugular venous return and circle of Willis in a theoretical human model of selective brain cooling. *Journal of applied physiology* 2007;103:1837-47.

100. Slotboom J, Kiefer C, Brekenfeld C, et al. Locally induced hypothermia for treatment of acute ischaemic stroke: a physical feasibility study. *Neuroradiology* 2004;46:923-34.
101. Neimark MA, Konstas AA, Lee L, Laine AF, Pile-Spellman J, Choi J. Brain temperature changes during selective cooling with endovascular intracarotid cold saline infusion: simulation using human data fitted with an integrated mathematical model. *Journal of neurointerventional surgery* 2013;5:165-71.
102. Slotboom J. Localized therapeutic hypothermia in the brain for the treatment of ischemic stroke. *Journal of applied physiology* 2007;102:1303-4.
103. Choi JH, Marshall RS, Neimark MA, et al. Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study. *AJNR American journal of neuroradiology* 2010;31:928-34.
104. Rumana CS, Gopinath SP, Uzura M, Valadka AB, Robertson CS. Brain temperature exceeds systemic temperature in head-injured patients. *Critical care medicine* 1998;26:562-7.
105. Ding Y, Li J, Rafols JA, Phillis JW, Diaz FG. Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2002;33:2492-8.
106. Ding Y, Yao B, Zhou Y, Park H, McAllister JP, 2nd, Diaz FG. Prereperfusion flushing of ischemic territory: a therapeutic study in which histological and behavioral assessments were used to measure ischemia-reperfusion injury in rats with stroke. *Journal of neurosurgery* 2002;96:310-9.
107. Ding Y, Young CN, Li J, et al. Reduced inflammatory mediator expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rats: a real-time polymerase chain reaction analysis. *Neuroscience Letters* 2003;353:173-6.
108. Ding YH, Li J, Rafols JA, Ding Y. Reduced brain edema and matrix metalloproteinase (MMP) expression by pre-reperfusion infusion into ischemic territory in rat. *Neuroscience letters* 2004;372:35-9.
109. Zhao WH, Ji XM, Ling F, et al. Local mild hypothermia induced by intra-arterial cold saline infusion prolongs the time window of onset of reperfusion injury after transient focal ischemia in rats. *Neurological research* 2009;31:43-51.
110. Ji YB, Wu YM, Ji Z, et al. Interrupted intracarotid artery cold saline infusion as an alternative method for neuroprotection after ischemic stroke. *Neurosurgical focus* 2012;33:E10.
111. Song W, Wu YM, Ji Z, Ji YB, Wang SN, Pan SY. Intra-carotid cold magnesium sulfate infusion induces selective cerebral hypothermia and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2012.
112. Chen J, Fredrickson V, Ding Y, et al. Enhanced neuroprotection by local intra-arterial infusion of human albumin solution and local hypothermia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2013;44:260-2.
113. Li J, Luan X, Lai Q, et al. Long-term neuroprotection induced by regional brain cooling with saline infusion into ischemic territory in rats: a behavioral analysis. *Neurol Res* 2004;26:677-83.
114. Luan X, Li J, McAllister JP, 2nd, et al. Regional brain cooling induced by vascular saline infusion into ischemic territory reduces brain inflammation in stroke. *Acta Neuropathol* 2004;107:227-34.

115. Ding Y, Li J, Luan X, et al. Local Saline Infusion into Ischemic Territory Induces Regional Brain Cooling and Neuroprotection in Rats with Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Neurosurgery* 2004;54:956-65.
116. Ji Y, Hu Y, Wu Y, et al. Therapeutic time window of hypothermia is broader than cerebral artery flushing in carotid saline infusion after transient focal ischemic stroke in rats. *Neurological research* 2012;34:657-63.
117. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010;375:1695-703.
118. Nemoto EM, Betterman K. Basic physiology of hyperbaric oxygen in brain. *Neurological research* 2007;29:116-26.
119. Poli S, Veltkamp R. Oxygen therapy in acute ischemic stroke - experimental efficacy and molecular mechanisms. *Current molecular medicine* 2009;9:227-41.
120. Liu S, Liu W, Ding W, Miyake M, Rosenberg GA, Liu KJ. Electron paramagnetic resonance-guided normobaric hyperoxia treatment protects the brain by maintaining penumbral oxygenation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006;26:1274-84.
121. Sunami K, Takeda Y, Hashimoto M, Hirakawa M. Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery. *Critical care medicine* 2000;28:2831-6.
122. Badr AE, Yin W, Mychaskiw G, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on striatal metabolites: a microdialysis study in awake freely moving rats after MCA occlusion. *Brain research* 2001;916:85-90.
123. Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, Rosenthal RE. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain research* 2003;971:90-4.
124. Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005;36:1679-83.
125. Yin W, Badr AE, Mychaskiw G, Zhang JH. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. *Brain research* 2002;926:165-71.
126. Singhal AB, Dijkhuizen RM, Rosen BR, Lo EH. Normobaric hyperoxia reduces MRI diffusion abnormalities and infarct size in experimental stroke. *Neurology* 2002;58:945-52.
127. Henninger N, Bouley J, Nelligan JM, Sicard KM, Fisher M. Normobaric hyperoxia delays perfusion/diffusion mismatch evolution, reduces infarct volume, and differentially affects neuronal cell death pathways after suture middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007;27:1632-42.
128. Schabitz WR, Schade H, Heiland S, et al. Neuroprotection by hyperbaric oxygenation after experimental focal cerebral ischemia monitored by MRI. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2004;35:1175-9.
129. Michalski D, Hartig W, Schneider D, Hobohm C. Use of normobaric and hyperbaric oxygen in acute focal cerebral ischemia - a preclinical and clinical review. *Acta Neurol Scand* 2011;123:85-97.

130. Singhal AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke. *Neurological research* 2007;29:173-83.
131. Anderson DC, Bottini AG, Jagiella WM, et al. A pilot study of hyperbaric oxygen in the treatment of human stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1991;22:1137-42.
132. Nighoghossian N, Trouillas P, Adeleine P, Salord F. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke. A double-blind pilot study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1995;26:1369-72.
133. Rusyniak DE, Kirk MA, May JD, et al. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: results of the Hyperbaric Oxygen in Acute Ischemic Stroke Trial Pilot Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2003;34:571-4.
134. Singhal AB, Benner T, Roccatagliata L, et al. A pilot study of normobaric oxygen therapy in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005;36:797-802.
135. Singhal AB, Ratai E, Benner T, et al. Magnetic resonance spectroscopy study of oxygen therapy in ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007;38:2851-4.
136. Padma MV, Bhasin A, Bhatia R, et al. Normobaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: A pilot study in Indian patients. *Annals of Indian Academy of Neurology* 2010;13:284-8.
137. Samson K. NEWS FROM THE AAN ANNUAL MEETING: Why a Trial of Normobaric Oxygen in Acute Ischemic Stroke Was Halted Early. *Neurology Today* 2013;13:34-5.
138. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001;21:2-14.
139. Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits does not promote brain lipid peroxidation. *Critical care medicine* 1995;23:1398-404.
140. Flynn EP, Auer RN. Eubaric hyperoxemia and experimental cerebral infarction. *Ann Neurol* 2002;52:566-72.
141. Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA, Huang PL. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003;23:1219-26.
142. Omae T, Ibayashi S, Kusuda K, Nakamura H, Yagi H, Fujishima M. Effects of high atmospheric pressure and oxygen on middle cerebral blood flow velocity in humans measured by transcranial Doppler. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1998;29:94-7.
143. Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circulation research* 2002;91:1031-7.
144. Nighoghossian N, Trouillas P. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue. *Journal of the neurological sciences* 1997;150:27-31.
145. Bacher A. Effects of body temperature on blood gases. *Intensive care medicine* 2005;31:24-7.
146. Wada K, Nishi D, Kitamura T, et al. Hyperbaric oxygenation therapy enhances the protective effect of moderate hypothermia against forebrain ischemia in the gerbil hippocampus. *Undersea Hyperb Med* 2006;33:399-405.

147. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1989;20:84-91.
148. Hua Y, Schallert T, Keep RF, Wu J, Hoff JT, Xi G. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke* 2002;33:2478-84.
149. Menniti FS, Ren J, Coskran TM, et al. Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009;331:842-50.
150. Fujiwara N, Mandeville ET, Geng X, et al. Effect of normobaric oxygen therapy in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011;42:1469-72.
151. Maier CM, Sun GH, Kunis D, Yenari MA, Steinberg GK. Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. *J Neurosurg* 2001;94:90-6.
152. Bronner G, Mitchell K, Welsh FA. Cerebrovascular adaptation after unilateral carotid artery ligation in the rat: preservation of blood flow and ATP during forebrain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998;18:118-21.
153. Henninger N, Bratane BT, Bastan B, Bouley J, Fisher M. Normobaric hyperoxia and delayed tPA treatment in a rat embolic stroke model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2009;29:119-29.
154. Korosue K, Heros RC, Ogilvy CS, Hyodo A, Tu YK, Graichen R. Comparison of crystalloids and colloids for hemodilution in a model of focal cerebral ischemia. *Journal of neurosurgery* 1990;73:576-84.
155. Bacher A, Illievich UM, Fitzgerald R, Ihra G, Spiss CK. Changes in oxygenation variables during progressive hypothermia in anesthetized patients. *Journal of neurosurgical anesthesiology* 1997;9:205-10.
156. Coetzee A, Swanepoel C. The oxyhemoglobin dissociation curve before, during and after cardiac surgery. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum* 1990;203:149-53.
157. Oda J, Kuwagata Y, Nakamori Y, et al. Mild hypothermia alters the oxygen consumption/delivery relationship by decreasing the slope of the supply-dependent line. *Critical care medicine* 2002;30:1535-40.
158. 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; a journal of cerebral circulation* 2001;32:553-60.
159. Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, et al. High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) Part 2: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial. *Lancet neurology* 2013;12:1049-58.
160. Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S, Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke Study I. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:439-45.
161. Patterson RH, Jr., McSherry CK, Schwartz MS. Hyperbaric oxygen, hypothermia, and cerebral ischemia in the dog. *The Journal of surgical research* 1968;8:279-85.

162. Topuz K, Colak A, Cemil B, et al. Combined hyperbaric oxygen and hypothermia treatment on oxidative stress parameters after spinal cord injury: an experimental study. *Arch Med Res* 2010;41:506-12.
163. Asif MJ, Exline MC. Utilization of hyperbaric oxygen therapy and induced hypothermia after hydrogen sulfide exposure. *Respiratory care* 2012;57:307-10.
164. Zinchuk VV. Prooxidant-antioxidant state after administration of lipopolysaccharide during correction of the L-arginine-NO system and affinity of hemoglobin for oxygen. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2001;131:28-32.
165. Esposito E, Ebner M, Ziemann U, Poli S. In cold blood: intraarterial cold infusions for selective brain cooling in stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2014;34:743-52.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Dr. med. univ. Matthias Ebner, habe gemeinsam mit Herrn Dr. Poli die Studie und das verwendete modifizierte Tiermodell für Post-Reperfusion Infusionen konzipiert. Ich führte die verblindete Messung des Infarkt volumens und des Ödem volumens aus und habe ca. 50% der funktionellen Testungen selbst durchgeführt. Zudem führte ich die Datenerfassung der gemessenen Vitalparameter und Blutuntersuchungen durch. Die Datenauswertung erfolgte durch mich unter Anleitung von Dr. Poli.

Die operativen Eingriffe im Rahmen der Experimente wurden von Frau Esposito, PhD durchgeführt. Frau Russo und Frau Wuttke führten insgesamt ca. 50% der funktionellen Testungen durch.

Herr Dr. Poli war an der Konzeption der Studie maßgeblich beteiligt und überwachte die Durchführung der Versuche. Er beriet mich bei der Datenauswertung und half bei der Korrektur des Manuskripts.

Herr Prof. Dr. Ziemann beriet die Forschungsgruppe bei der Durchführung der Versuche, hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Der im Rahmen der Versuche veröffentlichte Übersichtsartikel¹⁶⁵ basiert auf einer Literaturrecherche die von mir durchgeführt wurde. Das Manuskript wurde von mir, Herrn Dr. Poli und Frau Esposito erstellt. Herr Prof. Dr. Ziemann war an der Erstellung und der Korrektur des Manuskripts beteiligt.

8. Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurde folgender Übersichtsartikel veröffentlicht:

Esposito E*, Ebner M*, Ziemann U, Poli S. In cold blood: intraarterial cold infusions for selective brain cooling in stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2014;34:743-52.

*equally contributed