

Aus der Klinik für Neurochirurgie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Bertalanffy
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

Untersuchung neuroprotektiver Effekte der intrathekalen Baclofenapplikation

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg vorgelegt von

Alexander Ludolph
aus Fritzlar

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

am 20.04.06

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Professor Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Privatdozent Dr. med. Ralf Becker

Korreferent: Prof. Dr. med. N. Sommer

Meinen Eltern

„...Wahrheit an sich ist kostbar,
kostbarer aber noch [ist] die
Fertigkeit, sie zu finden.“

Alexander von Humboldt

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	9
1.1	BACLOFEN UND DER GABA _B -REZEPTOR	9
1.2	CEREBRALE ISCHÄMIE UND NEUROPROTEKTION	12
1.3	ABLEITUNG DER FRAGESTELLUNG	15
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	TIERE UND TIERHALTUNG	17
2.1.2	PHARMAKA	17
2.1.3	MATERIALIEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DER GLOBALEN, REVERSIBLEN, CEREBRALEN ISCHÄMIE DER RATTE SOWIE DER INTRATHEKALEN BACLOFENAPPLIKATION	18
2.1.4	MATERIALIEN ZUR IN-VIVO-FIXIERUNG DER RATTE	18
2.1.5	MATERIALIEN FÜR DIE HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER GEHIRNE	19
2.2	HERSTELLUNG UND LAGERUNG DER INJEKTIONSLÖSUNG	19
2.3	DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE	19
2.3.1	DURCHFÜHRUNG DER GLOBALEN, REVERSIBLEN, CEREBRALEN ISCHÄMIE DER RATTE	23
2.3.2	DIE DURCHFÜHRUNG DER INTRATHEKALEN APPLIKATION VON BACLOFEN MITTELS STEREOTAXIE	25
2.3.2.1	KURZE BESCHREIBUNG UND GRUNDZÜGE DER STEREOTAXIE	25
2.3.2.2	HERSTELLUNG DER INJEKTIONSKANÜLEN UND VERWENDETE GERÄTSCHAFTEN ZUR INJEKTION	26
2.3.2.3	ERMITTLUNG DER ZIELKOORDINATEN	27
2.3.2.4	DIE INTRATHEKALE APPLIKATION VON BACLOFEN	27

2.4	PERFUSION DER RATTEN UND ENTNAHME DER GEHIRNE	27
2.5	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER PARAFORMALDEHYDFIXIERTEN RATTENHIRNE	28
2.5.1	CÖLESTINBLAU-SÄUREFUCHSIN-FÄRBUNG	28
2.5.2	QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER SCHNITTE	29
2.6	STATISTIK	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1	EFFEKTE VON BACLOFEN AM MODELL DER TRANSIENTEN GLOBALEN HIRNISCHEMIE DER RATTE	31
3.1.1	EINFLUSS VON BACLOFEN AUF DIE NEURONALE SCHÄDIGUNG DES HIPPOCAMPUS	31
3.1.1.1	PRÄISCHÄMISCHE APPLIKATION	32
3.1.1.2	POSTISCHÄMISCHE APPLIKATION	33
3.1.2	EINFLUSS VON BACLOFEN AUF PHYSIOLOGISCHE PARAMETER	34
3.1.2.1	PRÄISCHÄMISCHE APPLIKATION	35
3.1.2.1.1	TEMPERATUR	35
3.1.2.1.2	BLUTGLUKOSESPIEGEL	36
3.1.2.1.3	MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK	36
3.1.2.1.4	SAUERSTOFFPARTIALDRUCK, KOHLENDIOXIDPARTIALDRUCK UND PH-WERTE DES BLUTES	37
3.1.2.2	POSTISCHÄMISCHE APPLIKATION	39
3.1.2.2.1	TEMPERATUR	39
3.1.2.2.2	BLUTGLUKOSESPIEGEL	40
3.1.2.2.3	MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK	40
3.1.2.2.4	SAUERSTOFFPARTIALDRUCK, KOHLENDIOXIDPARTIALDRUCK UND PH-WERTE DES BLUTES	41
3.2	MODELLEVALUATION	43

Inhaltsverzeichnis	7
3.3 ZUSAMMENFASSUNG	44
3.4 TABELLARISCHE GEGENÜBERSTELLUNG DER BEIDEN VERSUCHSARME	45
4. DISKUSSION	47
4.1 DISKUSSION DER METHODIK	47
4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	52
4.2.1 EFFEKTE DER INTRATHEKALEN BACLOFENAPPLIKATION AUF DIE ZELLSCHÄDIGUNG IM HIPPOCAMPUS	52
4.3 PERSPEKTIVEN	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	58
6. LITERATUR	60
7. ANHANG	71
7.1 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	71
7.2 LEBENSLAUF	73
7.3 DANKSAGUNG	75
7.4 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER UND LEHRERINNEN	76

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit versucht einen Beitrag zur Wirkung des selektiven GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen (Lioresal[®]) auf das zentrale Nervensystem unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen, durchgeführt am Modell der globalen und reversiblen Hirnischämie der Ratte, zu leisten.

1.1 BACLOFEN UND DER GABA_BREZEPTOR

Das künstliche GABA-Derivat Baclofen, β -[4-Chlorophenyl]-GABA (**Abb. 1.1**), in den 60er Jahren erstmals synthetisiert und seit Anfang der 70er Jahre als Substanz zur Behandlung der Spastik im klinischen Gebrauch (Bowery 2001), entfaltet seine Wirkung als selektiver Agonist am GABA_B-Rezeptor (Bowery et al. 1980). Dabei ist seine Geschichte eng mit der Subtypisierung der GABA-Rezeptoren in die Typen A und B verbunden, da erst das Vorhandensein einer selektiven (agonistischen) Substanz am Bicucullin-unempfindlichen GABA_BR die weitere Einteilung der GABA-Rezeptoren ermöglichte (Hill und Bowery 1981; Alger und LeBeau 2001).

Baclofen ist ein Stereoisomer oder Enantiomer mit einem Chiralitätszentrum. Es liegt in seiner gebrauchsfertigen Form als Racemat vor. Dabei stellt die pharmakologisch etwa 1000fach wirksamere Komponente des 1:1 Gemisches die des linksdrehenden R(-)-Baclofen dar (Olpe et al. 1978).

In der Klinik wird Baclofen intrathekal u.a. zur Linderung schwerer Spastiken im Rahmen von Rückenmarksschädigungen sowie traumatischer oder hypoxischer Hirnschädigungen eingesetzt (Penn et al. 1989; Becker et al. 1995; Becker et al. 1997; Korenkov et al. 2002).

Grundsätzlich besteht dabei die Möglichkeit der oralen Verabreichung, die auch bereits etwa zwei Jahrzehnte vor der intrathekalen Applikationsform verfügbar war. Da Baclofen die Blut-Hirn-Schranke jedoch nur in sehr geringem Umfang überwinden kann, muß es hierfür oftmals intrathekal appliziert werden, um eine ausreichende

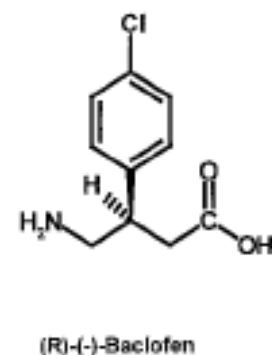


Abb. 1.1
Strukturformel des pharmakologisch wirksamen, linksdrehenden Baclofen-Enantiomers (aus: Bowery et al. 2002).

Medikamentenwirkung zu entfalten, bzw. um unerwünschte Medikamentenwirkungen, wie z.B. Schläfrigkeit, Erschöpfung oder Ataxien, zu verhindern (Ochs und Reimann 1995).

Neben der Spastiktherapie haben sich in den letzten Jahren zunehmend neue Indikationsfelder für die Baclofentherapie eröffnet. Baclofen zeigt Wirkung bei der Behandlung des therapieresistenten Singultus (Guelaud et al. 1995; Kumar und Dromerick 1998) sowie als supplementäre Substanz zur Verminderung der Entzugssymptomatik beim Kokainentzug (Ling et al. 1998).

Im Rahmen der klinischen Anwendung wurde neben einer deutlichen Verbesserung der Motorik und Lebensqualität bei Patienten mit spinaler oder supraspinaler Spastik (Sampson et al. 2002) auch eine Stabilisierung der vegetativen Funktionen bei akut hirngeschädigten Personen beobachtet, die mit intrathekalem Baclofen behandelt wurden (Becker et al. 2000).

Wie Eingangs erwähnt, wirkt Baclofen als selektiver Agonist am GABA_BR. Anders als beim ionotropen GABA_AR, welcher durch das Öffnen von Cl⁻-Ionenkanälen zu einer raschen Hyperpolarisation der Zellmembran, den fIPSPs, führt (Bormann 2000; Cherubini und Conti 2001), handelt es sich beim GABA_BR um einen metabotropen Rezeptor. Seine Aktivierung führt zu einer G-Protein-vermittelten Öffnung von Ca⁺⁺- und K⁺-Kanälen sowie zur Aktivierung des *second-messengers* Adenylatcyclase (Dutar und Nicoll 1988; Bowery et al. 2002) (**Abb. 1.2**). Er ist sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert, wobei die postsynaptisch lokalisierten GABA_BR primär zur Hyperpolarisation der Zellmembran durch Aktivierung von K⁺-Kanälen im Rahmen des sIPSP beitragen (Newberry und Nicoll 1985). Zu den präsynaptisch lokalisierten GABA_BR zählen auch die Autorezeptoren, über deren Aktivierung die Regulation der GABAergen Neurotransmission erfolgt (Alger und LeBeau 2001).

Während man zunächst dachte, dass es sich beim GABA_BR um einen ‚gewöhnlichen‘ metabotropen Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen handelt (Misgeld 1995), gelang Jones und Kollegen 1998 der Nachweis, dass der GABA_BR in seiner funktionsfähigen Form als Heterodimer mit den Untereinheiten (UE) B1 und B2 vorliegt (**Abb. 1.2**). Der GABA_{B2}-UE kommt dabei die Rolle der mit dem G-Protein interagierenden Komponente zu, während die GABA_{B1}-UE eine wesentliche Rolle in der Bindung mit den Agonisten und Antagonisten spielt (Margeta-Mitrovic et al. 2000; Calver 2001).

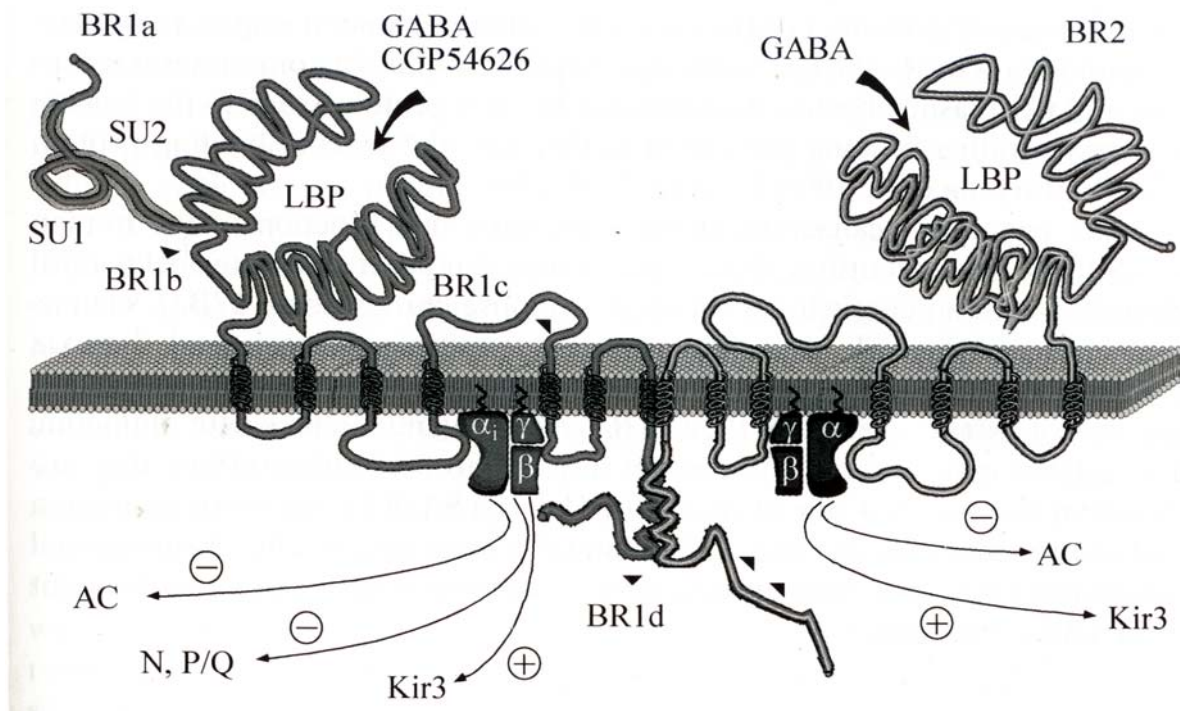


Abb.1.2: Strukturmodell des GABA_B-Heterodimers. Räumlich dargestellt sind die beiden Rezeptoren mit ihren Bindungsseiten sowie der jeweils spezifischen Rezeptoraktivität. Abkürzungen: AC Adenylatcyclase (- = Verminderung der AC-Aktivität); BR1a/b GABA_BR Untereinheit 1a/b; BR 2 GABA_BR Untereinheit 2; Kir 3 spezieller Kaliumkanal (+ = Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit); LBP Ligandbindungsstelle; N,P/Q Ca⁺⁺-Kanal (- = Verminderung der Leitfähigkeit des Ca⁺⁺-Kanals); SU1/2 Subunit. (aus: Bowery 2001)

Mittels autoradiographischer (Bowery et al. 1987; Chu et al. 1990) und immunhistochemischer (Billinton et al. 2000) Methoden lassen sich GABA_BR in unterschiedlicher Konzentration nahezu ubiquitär im ZNS sowie auch im Bereich der peripheren Organe (Castelli et al. 1999) nachweisen. Eine hohe Rezeptordichte findet man insbesondere im Bereich des Stratum moleculare des Cerebellums, des frontalen Cortex, des Thalamus sowie in der Substantia gelatinosa des spinalen Hinterhorns, wo Baclofen im Rahmen seiner Eigenschaft als Antispastikum seine Wirksamkeit durch die Verminderung exzitatorischer Einflüsse auf die α -Motoneurone entfaltet (Ochs und Reimann 1995; Orsnes et al. 2000). Jedoch lassen sich auch im Hippocampus GABA_BR in ausreichender Dichte nachweisen.

Die Dichte der GABA_BR ist nach Eintreten eines ischämischen Ereignisses zunächst unverändert, nimmt dann im Verlauf jedoch geringfügig ab, bei weiterhin vorhandener Fähigkeit Liganden zu binden, also intakter Rezeptorfunktion (Francis et al. 1999).

1.2 CEREBRALE ISCHÄMIE UND NEUROPROTEKTION

Die hier dargestellten Zusammenhänge können nur einen kurzen Einblick in das interessante Gebiet der Pathophysiologie der cerebralen Ischämie geben und beschränken sich schwerpunktmäßig auf die unmittelbar nach Ischämiebeginn eintretenden Ereignisse (**Abb. 1.3**).

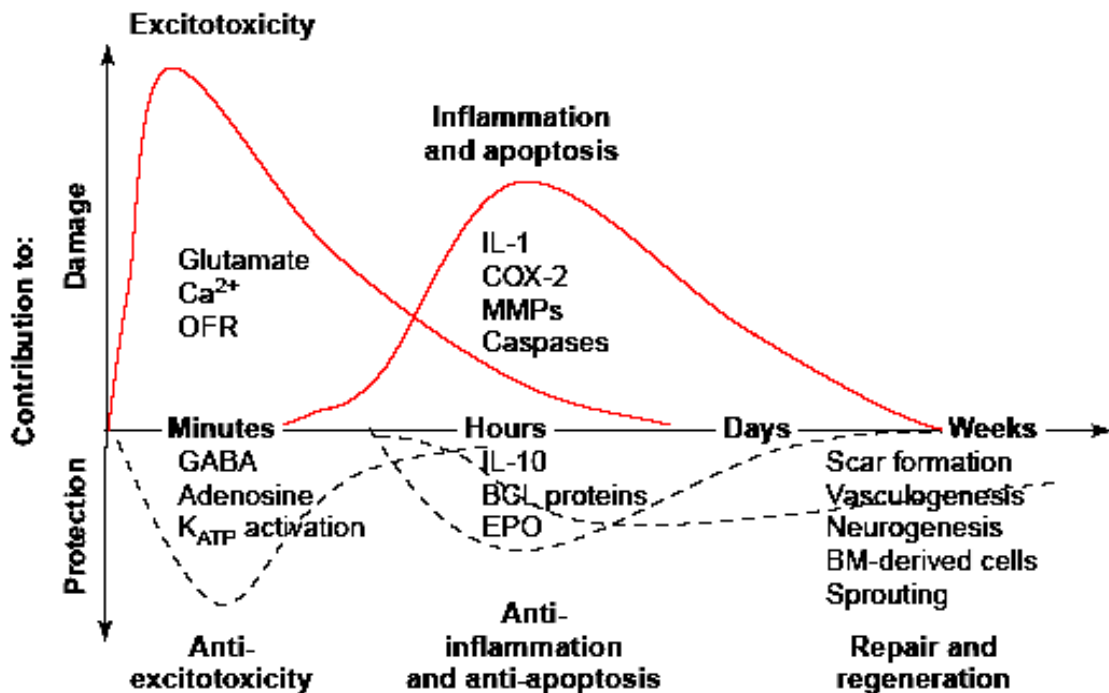


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der chronologischen Abläufe nach einem fokalen ischämischen Ereignis. Den destruktiven Einflüssen sind die putativen protektiven Einflüsse gegenübergestellt. Abkürzungen: BM bone marrow; COX-2 Cyclooxygenase vom Typ 2; EPO erythropoietin; IL-1 interleukin 1; OFR oxygene free radicals. (aus: Dirnagl et al. 2003)

Aufgrund mangelnder Energiespeicher ist das Hirngewebe abhängig von der kontinuierlichen Zufuhr von Glukose und Sauerstoff zur oxidativen Phosphorylierung. Eine regionale oder globale Verminderung der cerebralen Blutzufuhr resultiert in einer verminderten Fähigkeit der Neurone und Gliazellen zur Aufrechterhaltung funktionell wichtiger Ionengradienten (Martin et al. 1994). So kommt es beim unterschreiten der kritischen Flußgrenze von ca. $10\text{-}12 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g Hirngewicht}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Siesjö 1992) zu einem raschen Efflux von K^+ -Ionen und zur zellulären Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen über einen Antiportmechanismus (Harris et al. 1981), welche eine Depolarisation der neuronalen und glialen Zellmembran zur Folge haben (Katsura et al. 1994). Über eine Aktivierung präsynaptisch lokalisierter spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VSCC) erfolgt ein sukzessiver

Calziumeinstrom mit Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren (EAS), vorwiegend Glutamat. Glutamat werden insgesamt vier verschiedene Rezeptoren zugeordnet, darunter die ionotropen Rezeptoren vom NMDA-, AMPA- und Kainat- (KA)-Typ sowie der metabotrope Glutamatrezeptor (Obrenovitch und Urenjak 1997). Gelangt Glutamat unter oben genannten Umständen der Energiedeprivation in den synaptischen Spalt, so führt dies zu einer zusätzlichen postsynaptischen Erregung. Gleichzeitig kommt es aufgrund des Substratmangels zu einem Erliegen der energieabhängigen Transportersysteme zur Wiederaufnahme der Neurotransmitter. Dieser erstmals 1969 von Olney beschriebene Mechanismus der Exzitotoxizität stellt einen ersten Schritt zur Erklärung pathophysiologischer Veränderungen bei der cerebralen Ischämie dar und ist gleichzeitig Ansatzpunkt für die medikamentöse neuroprotektive Therapie. Substanzen die dabei als Neuroprotektiva in Frage kommen sind zum einen die Medikamente aus der Stoffgruppe der NMDAR-Antagonisten, wie z.B. MK-801(Dizocilpine), Memantine (Krieglstein et al. 1997) und der AMPAR-Antagonisten (Buchan et al. 1993). Weitere Mechanismen schließen all jene Substanzen mit ein, deren Wirkung die pharmakologische Verstärkung an einem inhibitorischen Rezeptorsystem beinhaltet. Dazu zählen z.B. 5-HT_{1A}R-Agonisten (Schaper et al. 2000) oder GABAR-Agonisten, wie Muscimol (Lyden und Lonzo 1994) oder Baclofen (s.u.). Ein generelles Problem der oben genannten Wirkstoffe bei der Behandlung cerebral-ischämischer Erkrankungen stellt das enge zeitliche Fenster aufgrund der beschränkten Dauer der Exzitotoxizität dar (**Abb. 1.3**; Dirnagl et al. 1999).

Kleintiermodelle zur Erforschung der cerebralen Ischämie gehören seit ca. drei Jahrzehnten zu einem festen Instrument in der medizinischen Wissenschaft (Block 1999). Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Schädigungsmechanismen:

1. die fokale cerebrale Ischämie und
2. die globale cerebrale Ischämie

Während Versuche an Modellen der fokalen cerebralen Ischämie im wesentlichen thrombo-embolische Infarkte simulieren, die nur einen Teil des Gehirns - meist die von der Arteria cerebri media versorgten Areale - betreffen, wird bei den Modellen der globalen cerebralen Ischämie versucht, einen kurzzeitigen cerebralen Perfusionsstillstand, oder zumindest eine hochgradige Perfusionsminderung, zu

erzielen. Dabei werden überwiegend in besonders ischämieempfindlichen Arealen des Gehirns, z. B. in Teilen der Hippocampus-Formation, Schädigungen erzeugt.

Anders als der ‚Gerbil‘ (*Meriones unguiculatus*), dessen cerebrale Durchblutung durch einen anlagegemäß nicht vorhandenen *Circulus arteriosus* ausschließlich über die *Arteriae carotides* gewährleistet ist (Levine und Payan 1966), verfügt die Ratte über ein intaktes Netz kommunizierender Arterien im Bereich der Schädelbasis, welches eine suffiziente Durchblutung bei Okklusion der vorderen oder hinteren hirnersorgenden Gefäße gewährleistet (Corbett 1998). Aufgrund dieser guten Kollateralisation ist zum Erzielen einer ausreichenden Perfusionsminderung im Bereich des Großhirns die Unterbindung des vorderen und des hinteren Hirnkreislaufs notwendig. Dies kann grundsätzlich über zwei unterschiedliche Wege erreicht werden.

Zum einen besteht die Möglichkeit der Unterbindung aller vier hirnersorgenden Arterien in einem Vier-Gefäß-Okklusionsmodell. Dabei erfolgt der zeitweise Verschluss der Carotiden in Verbindung mit der permanenten (Pulsinelli-Modell) oder transienten Okklusion der Vertebralarterien (hier etabliertes Modell). Ein weiterer Weg zur Erzeugung einer suffizienten globalen Großhirnischämie kann mit dem Zwei-Gefäß-Okklusionsmodell erzielt werden. Hierbei werden ebenfalls die Carotiden zeitweise verschlossen. Die eigentliche Ischämie wird jedoch durch eine medikamentös herbeigeführte kurzzeitige systemische arterielle Hypotension induziert (Smith et al. 1984a).

Pulsinelli und Brierley publizierten 1979 erstmals ein Vier-Gefäß-Modell zur Untersuchung der globalen Ischämie. Dabei wurden die Tiere am ersten Tag narkotisiert. Über einen dorsalen Zugang zur Halswirbelsäule wurden die *Arteriae vertebrales* auf Höhe des Atlas über die *Foramina alaria* mittels unipolarer Stromeinwirkung verschlossen. Am nächsten Tag erfolgte dann über einen ventralen Zugang zu den *Arteriae carotides communes* deren zeitweiser Verschluss bei der nicht narkotisierten Ratte (Pulsinelli und Brierley 1979).

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Ischämiemodell stellt insofern eine Modifikation des oben beschriebenen Modells dar, als dass der Zugang zur Halswirbelsäule und den *Arteriae vertebrales* unter Sicht und von vorn erfolgt. Ferner wurden die Experimente jeweils am gleichen Tag und in Narkose durchgeführt.

Diese Form der globalen Hirnischämie, sowie die nachfolgende Beobachtung hippocampaler Schädigungen stellen etablierte Modelle zur Untersuchung neuroprotektiver Mechanismen dar (Ginsberg und Busto 1989; Johansen 1993; Kriegstein 1997)

1.3 ABLEITUNG DER FRAGESTELLUNG

Es besteht Grund zur Annahme, dass intrathekal verabreichtes Baclofen in seiner Eigenschaft als Agonist an einem inhibitorischen Rezeptorsystem neben den klinisch bereits etablierten, oben genannten Effekten, auch ein nicht unerhebliches neuroprotektives Potential besitzt, welches jedoch noch nicht hinreichend am in-vivo-Modell untersucht ist. Dies ist jedoch, gerade im Hinblick auf die mögliche Anwendung Baclofens bei akut hirngeschädigten Patienten dringend erforderlich.

Bei der Wahl eines adäquaten Tiermodelles erscheint, auch, oder gerade im Hinblick auf die klinische Fragestellung, ein Modell zur Untersuchung cerebral-ischämischer Ereignisse am geeignetsten, da

1. cerebral-ischämische Erkrankungen, oder weiter gefaßt, Erkrankungen in deren Verlauf es zu einer Verminderung der Hirndurchblutung kommt, bei einem Großteil des neurologischen und neurochirurgischen Intensivkrankengutes vorkommen;
2. Tiermodelle der cerebralen Ischämie gut reproduzierbare und validierte Ergebnisse liefern (Ginsberg 1989).

Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei Baclofen um einen GABA_B-Agonisten. Es wird in diesem Versuchsmodell über eine stereotaktische Punktion in einer Dosis von 6 µg/kg KG in den Seitenventrikel der narkotisierten Ratte injiziert.

Durch in-vitro-Experimente konnte gezeigt werden, daß Baclofen selektiv am GABA_B-Rezeptor bindet (Bowery et al. 1980) sowie über die Kontrolle von G-Proteingesteuerten K⁺-Kanälen zur Entstehung des späten inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IIPSP) beiträgt (Newberry und Nicoll 1984; Karlsson und Olpe 1989).

Es liegen bereits einige tierexperimentelle Untersuchungen systemisch verabreichten Baclofens in Zusammenhang mit Ischämiestudien, mit allerdings sehr heterogenen

Ergebnissen, vor (Pettigrew et al. 1988; Rosenbaum et al. 1989; Araki et al. 1991; Babcock et al. 2002). In-vivo-Versuche an Baclofen-behandelten Ratten führten zu einer signifikanten Verringerung der ischämischen und postischämischen Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat (Pettigrew et al. 1988). Glutamat spielt über seine n-Methyl-d-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-vermittelte Aktivität eine wesentliche Rolle bei der exzitatorischen neuronalen Schädigung. Dieses als Exzitotoxizität (Olney 1969) beschriebene Phänomen führt über eine Erhöhung der NMDA-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Leitfähigkeit der postsynaptischen Membranen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation mit sukzessivem Zusammenbruch der Ca^{2+} -Homöostase und letaler Zellschädigung (Hartley et al. 1993). Es ist nachgewiesen, daß hypoxische Zustände zu einer mehrfachen Erhöhung der Glutamat-Konzentration im zentralen Nervensystem führen (Johansen 1993.) Anhand dieser Zusammenhänge ist es naheliegend, daß GABA, bzw. GABA-Rezeptor-Agonisten über ihre Fähigkeit zur postsynaptischen Membranhyperpolarisation zu einer Verringerung der spannungsabhängigen NMDA-Rezeptor-Aktivität beitragen können (Lyden 1997). Für Muscimol, einen GABA_A -Rezeptor-Agonisten konnte in Kombination mit MK-801 (Dizocilpine, ein NMDA-Rezeptor-Antagonist) eine neuroprotektive Wirkung tierexperimentell erzielt werden (Lyden und Lonzo 1994).

Fragestellung

Vor dem Hintergrund der in der Einleitung dargestellten Thematik und Datenlage ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Besitzt intrathekal verabreichtes Baclofen in Dosis von 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG in dem hier vorgestellten und verwendeten Modell der transienten, reversiblen Vorderhirnischämie der Ratte einen neuroprotektiven Effekt?
2. Rechtfertigen die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse die Anwendung von Baclofen in der Akutphase neurologischer/neurochirurgischer Erkrankungen?

2. Material und Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 TIERE UND TIERHALTUNG

Männliche Wistar-Ratten (250-400 g) wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden unter konstanten klimatisierten Bedingungen bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus im Tierstall gehalten (die Raumtemperatur betrug $23 \pm 1^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5 \%$). Die Unterbringung erfolgte zu maximal vier Tieren in dafür vorgesehenen Käfigen (42*26*19 cm).

Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin®, Lage) und Wasser. Am Abend vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen; bei jedoch weiterhin ungehindertem Zugang zu Wasser.

2.1.2 PHARMAKA

Baclofen	Lioresal® 2mg/ml; Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Halothan	Fluothane®; Zeneca GmbH, Frankfurt/Main
Heparin	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen
Lachgas	Messer-Grießheim, Siegen
Medizinischer Sauerstoff	Messer-Grießheim, Siegen
Xylocain Gel® 2 %	Astra, Wedel

2.1.3 MATERIALIEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DER GLOBALEN, REVERSIBLEN CEREBRALEN ISCHÄMIE DER RATTE, SOWIE DER INTRATHEKALEN BACLOFENAPPLIKATION

Chirurgischer Faden - 10/0 Ethilon® BV-2, Ethicon, Norderstedt	
0,15 m	
- 6/0 Vicryl®	Ethicon, Norderstedt
- 4/0 Vicryl®	Ethicon, Norderstedt
Dreiwegehahn, Connecta® Plus 3	Ohmeda, Helsingborg, Schweden
Faden, Miniking 1000 m	Meisinger, Deutschland
Hautdesinfektionsmittel, Skinsept®	Henkel-Ecolab, Düsseldorf
Kanüle, 24 G, 'Microlance 3'	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Lyostypt®	Braun Dexon, Spangenberg
Natriumchlorid 0,9%; Druckinfusionsbeutel 0,5 l	Baxter, Unterschleißheim
Natriumchlorid 0,9%	B.Braun AG, Melsungen
PE-Schlauch zur Blutdruckaufnahme	B.Braun, Melsungen
PE-Schlauch, ID 0,58 mm/ AD 0,96 mm	Portex, UK
Venenverweilkanüle ‚Abbocath-®F‘, 26 G	Abbott, Wiesbaden
Wasserstoffperoxid-Lösung 2%	Zentralapotheke des Klinikums der Phillips-Universität Marburg

2.1.4 MATERIALIEN ZUR IN-VIVO-FIXIERUNG DER RATTE

KH_2PO_4	Riedl de Haen, Seelze
Natriumchlorid	Riedl de Haen, Seelze
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 MATERIALIEN FÜR DIE HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER GEHIRNE

Ammoniumeisen(II)sulfat	Merck, Darmstadt
Cölestinblau	Sigma, Deisenhofen
Eisessig	
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Isopropanol	
Konz. Salzsäure	Fluka Chemie, Berlin
Kresylechtviolett	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Paraffin	
Rotihistol®	Roth, Karlsruhe
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt
Toluol	Sigma, Deisenhofen

2.2 HERSTELLUNG UND LAGERUNG DER INJEKTIONS-LÖSUNG

Die Tiere erhielten 1,5 µg (5 µl) Baclofen als i.c.v. Injektion. Dazu wurde die erhaltene Lösung im Verhältnis 1: 6,6 mit Aqua dest. verdünnt. Die Lösung wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Den in den Kontrollgruppen behandelten Tieren wurde die entsprechende Menge einer isotonen Kochsalzlösung verabreicht.

2.3 DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

Die Versuche der globalen, reversiblen, cerebralen Ischämie wurden an einem im eigenen Labor entwickelten 4-Gefäß-Okklusions-Modell (4VOM) durchgeführt. Es umfasst den Verschluss beider Aa. carotides communes (CCAO), sowie beider Aa. vertebrales (VAO) kurz vor den Eintritt beider Gefäße in den 6. cervicalen Vertebra. Es unterscheidet sich hierin von dem geläufigen, von Pulsinelli und Brierley (1979)

vorgestellten 4VOM. Bei diesem Modell wird die VAO durch die monopolare Verödung des Gefäßes via Foramen alare des Atlas erreicht. Da dieses Vorgehen nur 'blind' durchgeführt werden kann, man somit keine Information über das Ausmaß des Gefäßverschlusses bekommt, wurde es vom Autor abgelehnt und durch das im Folgenden dargestellte ersetzt.

Initial wurden die Tiere in einer Kammer mit einem Gemisch aus 4 % Halothan in Stickoxydul/Sauerstoff (2:1) anästhesiert. Es erfolgte die Lagerung auf dem Operationstisch und die Verabreichung von 1,5 % Halothan in o.g. Gemisch über eine Atemmaske.

Der Narkoseeintritt wurde über die Erzeugung eines

Schmerzreflexes an Hinterpfote und Schwanz überprüft. Die Körperkerntemperatur wurde mittels eines rektal eingeführten Thermometers (TSE, Bad Homburg v.d.H.), welches über ein Kontrollsystem (TSE, Bad Homburg v.d.H.) mit dem beheizbaren OP-Tisch (TSE, Bad Homburg v.d.H.) verbunden war, ermittelt, und bei 37,0 °C gehalten (**Abb. 2.1**).

Zusätzlich wurde eine Nadelthermometerelektrode (TSE, Bad Homburg v.d.H.) zwischen Kopfhaut und Cranium plaziert. Diese Elektrode steuerte über das gleiche System eine Rotlichtlampe, die dazu diente, den Kopf des Tieres während der 4VO zu erwärmen und die Gehirntemperatur konstant zu halten. Sie wurde nur intraischämisch genutzt.

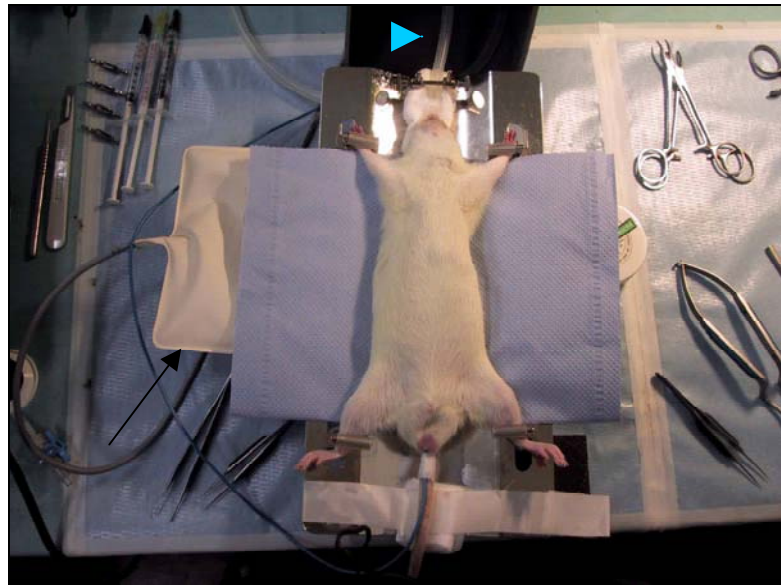
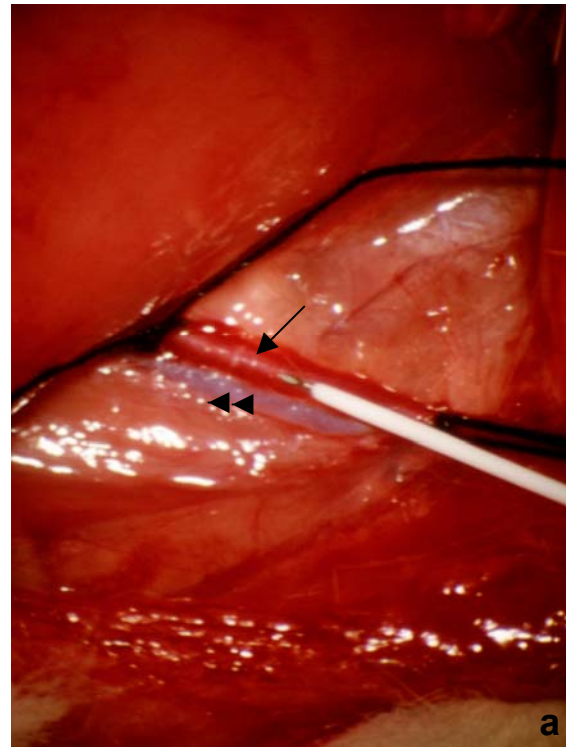


Abb. 2.1: Darstellung des Versuchstieres auf dem Operationstisch mit gut erkennbarer Thermodecke (Pfeil), Instrumentarium und Narkosezufuhr (Pfeilspitze). (Das Bild wurde freundlicherweise von Herrn Florian Stubenvoll zur Verfügung gestellt.)

Zunächst erfolgte über einen Leistenschnitt die mikrochirurgische Präparation der Arteria femoralis unter einem Operationsmikroskop (Typ M 650, Wild, Schweiz) bei 6facher Vergrößerung. Sie wurde sorgfältig von anliegender Vene und Nerv mobilisiert und bis zu ihrer Bifurkation im Oberschenkelbereich dargestellt. Distal wurde ein Faden um das Gefäß gelegt und damit verschlossen. Er wurde an einer Klemme befestigt und diente somit als Widerlager. Um eine Dilatation des Gefäßes zu erzielen, wurde Xylocain



Gel® aufgetragen. Anschließend wurde eine Verweilkanüle gelegt (**Abb. 2.2 a**) und über einen Stich sicher in der Oberschenkelmuskulatur fixiert. Die Kanüle wurde über einen zur Blutdruckmessung geeigneten Polyäthylenschlauch mit einem Druckaufnehmer (Gould P23, Statham, USA) verbunden. Dieser war mit einem Blutdruckmessgerät (HSE, March-Hugstetten) zur Ermittlung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) verbunden. Zusätzlich war das System über einen gesonderten Zugang mit einer Druckinfusionsmanschette (Biotest, Dreieich) versehen, welche eine Spülung des Systems mit einem ausreichend hohen Druck ermöglichte.

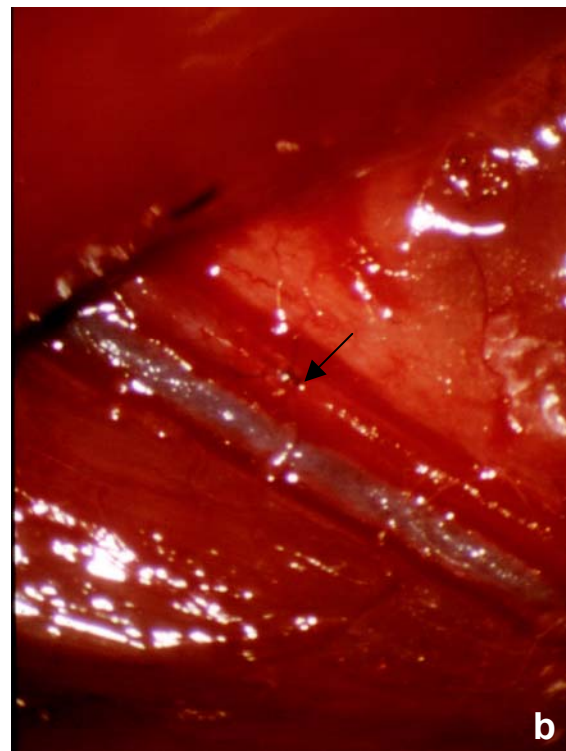


Abb. 2.2 (Vorseite)

(a): Dargestellt ist der Situs mit der präparierten A. femoralis dextra vor Kanülierung. Der Pfeil markiert das Gefäß. Die beiden Pfeilspitzen stellen die V. femoralis dextra dar.
 (b): Zu sehen ist das mittels zweier Mikronähte bereits verschlossene und wieder perfundierte Gefäß (Pfeil).

Ein zwischen Kanüle und Polyäthylenschlauch geschalteter Dreiwegehahn diente der Entnahme geringer Mengen Blutes zur Ermittlung physiologischer Parameter – Blutgasanalyse (BGA) und Serumblutglukose. Die BGA wurde mittels eines Blutgasanalysators (Blutgasanalysator 248, Chiron, Gießen), der Blutglukosegehalt mittels eines Glukoseanalysators (Typ 2, Beckman, München) ausgewertet.

Abb. 2.3: Schema zur Darstellung der Versuchsabläufe

	Präischämische Applikation:				Postischämische Applikation:			
	MABD	Glu	T	BGA	MABD	Glu	T	BGA
1.initial	+	+	+	+	1.initial	+	+	+
2.post applicationem	+		+		2.post occlusionem	+		+
3.post occlusionem	+		+	+	3.5' p. occlusionem	+		+
4.5' p. occlusionem	+		+	+	4.10' p. occlusionem	+		+
5.10' p. occlusionem	+		+	+	5.post applicationem	+		+
6.Versuchsende	+	+	+	+	6.Versuchsende	+	+	+

Abkürzungen:BGABlutgasanalyse;Glu Blutglukosespiegel; MABD mittlerer arterieller Blutdruck; T Temperatur

Um eine Minderversorgung der Hinterpfote bei den durch das Vorgehen sehr gezeichneten Tieren zu verhindern, wurde nach Beendigung der Operation die Verweilkanüle gezogen, das Gefäß proximal temporär mit einem Aneurysma-Clip verschlossen und die Einstichstelle mit einem sehr feinen Faden (10/0) durch zwei bis drei Stiche verschlossen (**Abb. 2.2 b**). Der vorher angelegte distale Faden wurde entfernt. Das Instrumentarium für diesen Eingriff umfasste einen Mikronadelhalter (Typ FD 246, Aesculap, Tuttlingen), zwei gerade Mikropinzetten (Gr. 5), sowie eine

gerade Mikroschere (Typ FD 105, Aesculap, Tuttlingen). Die Hautwunde wurde mit einem Faden (4/0) geschlossen.

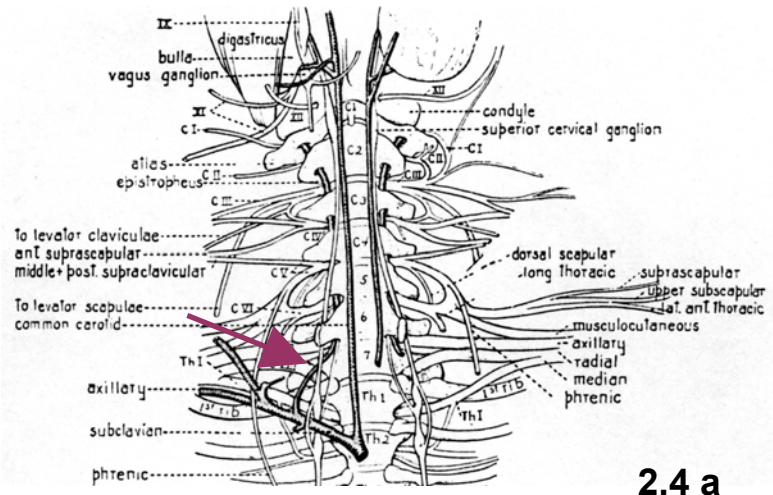
Das gesamte Vorgehen wurde in einem angefertigten Protokoll (**Abb. 2.3**) individuell festgehalten. Es enthielt die in den Versuchen gewonnenen physiologischen Parameter, Gewicht am Behandlungstag und am Tag der Perfusion, eine möglichst detaillierte Beschreibung der Aufwachzeit, der Reaktion auf Schmerzreize, der Motorik und Koordination der gerade erwachten Tiere, sowie den Vermerk etwaiger Besonderheiten (aufgetretene Krämpfe, etc...).

Die Tiere wurden 90 min nach Induktion der Ischämie überwacht, danach erfolgte die Narkoseausleitung. Sie wurden in den Käfig gelegt, und bis zum Erwachen bei ca. 30 °C unter einer Rotlichtlampe belassen.

2.3.1 DURCHFÜHRUNG DER GLOBALEN, REVERSIBLEN, CEREBRALEN ISCHÄMIE DER RATTE

Zur Präparation der hirnversorgenden Gefäße war es notwendig das Tier mit dem Kopf zum Operateur zu drehen. Der Operationstisch wurde um ~ 20° zum Kopf des Tieres hin angewinkelt. Das Operationsmikroskop wurde ebenfalls aus seiner senkrecht zum Tier befindlichen Stellung in einen Winkel von etwa 45° zum Tier gebracht. Es erfolgte ein medialer, ventraler Halsschnitt vom Hyoidrand bis circa ein cm über das obere Sternum reichend. Die nachfolgend beschriebenen Operationsschritte wurden gänzlich mikrochirurgisch durchgeführt. Das sehr ausgeprägte, nahezu den ganzen ventralen Halsbereich einnehmende Drüsengewebe wurde medial gespalten, vom darunterliegenden Fasziengewebe präpariert und nach lateral mobilisiert. Ein stumpfer Wundspreizer (Typ BV 74, Aesculap, Tuttlingen) wurde eingesetzt um das Operationsfeld freizuhalten. Um für das weitere Vorgehen Platz zu gewinnen, wurden die intermuskulären Adhäsionen der Mm. sternomastoidei medial bis zum Sternum mit einer geraden Mikroschere (Typ FD 105, Aesculap, Tuttlingen) getrennt (**Abb. 2.4 b**). Der M. sternomastoideus einer Seite wurde mit Hilfe eines Fadens und einer gebogenen Mikropinzette (Gr. 7, Dumant & Fils, Schweiz) nach lateral mobilisiert. Die nun sichtbare CCA wurde vom darüberliegenden Gewebe getrennt, der N. vagus dargestellt und vorsichtig vom Gefäß präpariert (**Abb. 2.4 c**). Ein zur späteren Mobilisation dienender Faden wird unterhalb der Arterie hindurchgezogen. Im Anschluss wurde der gut tastbare Processus laminaris (syn.: *Proc. carotideus*) des 6. HWK aufgesucht. Diese medial

der CCA liegende knöcherne Vorwölbung des Proc. transversus diente als wichtige Orientierungshilfe beim auffinden des 6. HWK. Die Muskulatur entlang des Processus wurde



abpräpariert. Es kamen die Nervenwurzeln C VII kranial und C VIII kaudal zum Vorschein. Zwischen diesen Wurzeln, und nach medial von einem Band bedeckt, befand sich die A. vertebralis. Sie wurde vorsichtig mit einer spitzen, geraden Mikropinzette (Gr. 5, Dumant & Fils, Schweiz) und der gebogenen Mikropinzette von den umgebenden Strukturen präpariert (**Abb. 2.4 d**). Dann erfolgte der Verschluss des Gefäßes durch einen Aneurysma-Miniclip (Typ FE 728K, bzw. FE 717K, Aesculap, Tuttlingen) mittels einer Applikator-Zange (Typ FD 648, Aesculap, Tuttlingen) (**Abb. 2.4 e**).

Nach Applikation des Clips wurde der korrekte Sitz nochmals überprüft. Nun wurde die Präparation auf der Gegenseite wiederholt.

Nach erfolgter VAO wurde der Operationstisch wieder in seine normale Lage zurückgebracht, der Kopf der Ratte über eine Rotlichtlampe gelegt, die beiden CCA an den Fäden angehoben und mittels kleiner Gefäßclips für 10 min verschlossen.

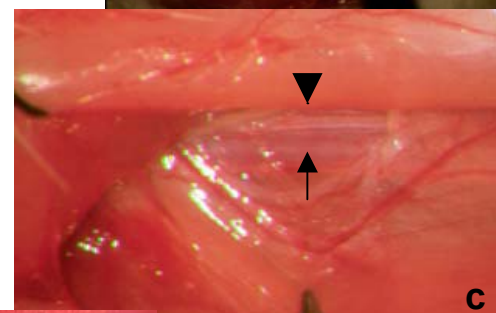
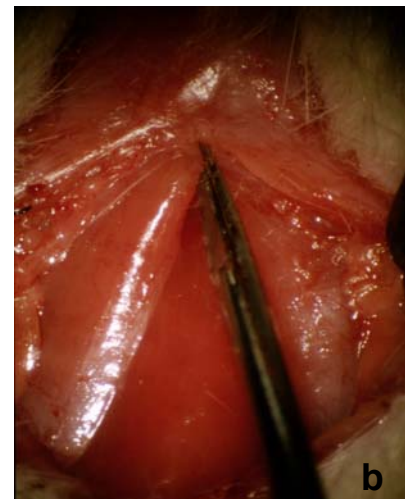


Abb. 2.4 (Vorseite):

(a): Topographische Anatomie der cervikalen Wirbelsäule der Ratte mit Darstellung der Nerven und Gefäße. Der Pfeil zeigt die A. vertebralis kurz vor dem Eintritt in den sechsten Halswirbelkörper (aus Hebel 1976).

(b): Präparation des M. sternomastoideus am Sternum. (c): Darstellung des Gefäß-Nerven-Bündels mit A. carotis communis (Pfeil) und N. vagus (Pfeilspitze). (d): Präparation der A. vertebralis mit Mikroinstrumentarium (Pfeil). (e): Okklusion der A. vertebralis mit einem gebogenem Miniclip unter Sicht.

2.3.2 DIE DURCHFÜHRUNG DER INTRATHEKALEN APPLIKATION VON BACLOFEN MITTELS STEREOTAXIE

2.3.2.1 KURZE BESCHREIBUNG UND GRUNDZÜGE DER STEREOTAXIE

Die Stereotaxie ist ein operatives Verfahren, das es ermöglicht - anhand eines dreidimensionalen Koordinatensystems - Punkte im zentralen Nervensystem präzise anzuvisieren. Die hierfür notwendigen Zielpunkte werden einem Hirnatlanten entnommen, welcher die aus zahlreichen Rattenhirnen erfassten Daten gemittelt in Form von histologischen Schnitten unter Angabe der jeweiligen Ebene, darstellt. In dieser Studie fand der verbreitete Atlas von Paxinos und Watson („The Rat Brain in Stereotactic Coordinates“, George Paxinos & Charles Watson, Academic Press, Sydney 1986) Verwendung. Als Bezugs-, bzw. Ausgangspunkt für die Anwendung der Koordinaten dient die Interaurallinie.

Die aus dem Atlas entnommenen Koordinaten wurden mit Hilfe eines ‘Dummies’ (engl. *Attrappe*) am Stereotaxen simuliert und mit der später eingesetzten Zielvorrichtung übereingebracht. Der Dummy wurde entfernt und das Tier mittels zweier Ohrpins – entsprechend der Interaurallinie als Ausgangspunkt (0/0/0 = anterior/lateral/vertikal in mm) - im Gestell fixiert.

Mit der Stereotaxie können, wie in dieser Studie geschehen, Injektionen vorgenommen werden, um etwa die zentrale Wirkung von Medikamenten im Rattenmodell zu untersuchen. Eine andere Anwendungsform stellt die in jüngerer Zeit entwickelte Methode der Microdialyse dar, bei welcher über die Implantation spezieller, zur Dialyse geeigneter Kanülen, zentralnervöse Stoffwechselforgänge ermittelt werden können.

2.3.2.2 HERSTELLUNG DER INJEKTIONSKANÜLEN UND VERWENDETE GERÄTSCHAFTEN ZUR INJEKTION

Glaskapillaren (ID 0,6 mm/ AD 1,0 mm) wurden in einem 'Nadelzieher' (Modell 750, Kopf, USA) an deren Spitze auf ca. 0,2 mm verdünnt. Sie wurden über den Schaft einer Kanüle mit einem entsprechend dünnen PE-Schlauch (0,58 mm/ 0,96 mm) verbunden und verklebt (Sekundenkleber, UHU). Das Ende des PE-Schlauches wurde mit einer Präzisionspritze (1,0 ml. CMA) verbunden. Die Kapillare wurde dann am Zielarm des Stereotakten festgeklemmt. Eine für die Gabe kleiner Volumina vorgesehene Spritzenpumpe (Modell 802, Univentor, Zejtun, Malta) steuerte die Injektion.

2.3.2.3 ERMITTLUNG DER ZIELKOORDINATEN

Ziel der Injektion war der rechte Seitenventrikel. Seine größte Ausdehnung besitzt er etwa im Bereich von 7,7 mm anterior; 2,0 mm lateral; 6,5 mm vertikal. Die Koordinaten sind o.g. Atlas entnommen.

2.3.2.4 DIE INTRATHEKALE APPLIKATION VON BACLOFEN

Es wurden zwei Versuchsgruppen (sowie deren Kontrollgruppen) gebildet. In Gruppe 1 erfolgte die i.c.v. Baclofengabe 15 min vor Beginn der Ischämie, in Gruppe 2 30 min nach Beendigung der Ischämie. Zur Vorbereitung der Injektion wurden die Ratten wie oben beschrieben in ein Stereotaxiestell (David Kopf Instruments, USA) eingespannt. Der Abstand zwischen den Pins betrug bei allen Tieren bis 350 g 10 mm, bei Tieren über 350 g KG 11-12 mm. Anschließend wurden die oberen Dentales incisivi in einen in der Länge und in der Höhe beweglichen Rahmen eingespannt. Dieser wurde in der Höhe bewegt bis sich der Schädel des Tieres in der Horizontalen befand. Das Fell wurde mit einem Skalpell (Gr. 15, Feather, USA) medial über dem Cranium eingeschnitten, das darunterliegende Gewebe mit einer Schere (FD 105, Aesculap, Tuttlingen) gespalten und mit einem Dissektor (FF 300 R, Aesculap, Tuttlingen) zur Seite mobilisiert. Zur Vermeidung einer Infektion wurde das Wundgebiet weiträumig mit Desinfektionsmittel behandelt. Die Zielvorrichtung, an deren Spitze sich die Injektionskapillare befand wurde positioniert. Die spätere

Eintrittsstelle - etwa 1-2 mm hinter dem Bregma gelegen - wurde markiert . Mit einer kleinen Handbohrmaschine (Modell Minimot 40, Proxxon, Deutschland; Bohrer 1,0 mm, Meisinger, Deutschland) wurde der Schädel in einem Durchmesser von ca. 1,5 mm trepaniert, die darunterliegende Dura mit einer gebogenen Kanülenspitze (24 G) inzidiert, und durch das Auftragen von Wasserstoffperoxid eine erneute Desinfektion vorgenommen. Die Injektionskanüle wurde auf die ermittelten Koordinaten eingestellt.

5 µl (1,5 µg) Baclofen-Lösung wurden über einen Zeitraum von 5 min gegeben. Die Kanüle wurde anschließend entfernt, und das Unterhautgewebe mit einer fortlaufenden Naht (6/0) sorgfältig verschlossen. Das Fell wurde ebenfalls mit einer Naht (4/0) geschlossen.

2.4 PERFUSION DER RATTEN UND ENTNAHME DER GEHIRNE

Zur Entstehung der hippocampalen Schädigung war es notwendig, die Tiere der Versuchsgruppen in denen Baclofen prä- und postischämisch appliziert wurde - sowie der Kontrollgruppen - sieben Tage überleben zu lassen.

Die Tiere wurden tief mit Halothan narkotisiert. Der obere Bauchraum wurde eröffnet, das Diaphragma inzidiert und der Rippenbogen beidseits durchtrennt und zur Seite geklappt. Es erfolgte die Präparation des Herzens. Der linke Ventrikel wurde mit einer Schere durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Eine stumpfe Kanüle wurde eingeführt, bis zur Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer Gefäßklemme fixiert. Die Kanüle war mit einer Perfusionspumpe (Cole Parmer Instruments, Chicago, USA) verbunden. Über diese wurden zuerst etwa 50 ml einer physiologischen Kochsalzlösung infundiert. Die Fixierung erfolgte über die Perfusion von circa 300 ml einer 4 %igen, Phosphat-gepufferten Paraformaldehydlösung über einen Zeitraum von 10 min. Anschließend wurden die Ratten mit einer Kleintierguillotine geköpft. Das Gehirn wurde sorgfältig aus dem Cranium freipräpariert und zur weiteren Immersionsfixierung im o.g. Medium für zwei Tage bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Lagerung wurden die Hirne dann in gekühltes, 70 %iges Ethanol gelegt.

PBS-gepufferte Paraformaldehydlösung:

KH ₂ PO ₄	0,144 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	0,526 g
NaCl	8 g
Paraformaldehyd	40 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

pH ~ 7,4

2.5 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER PARAFORMALDEHYDFIXIERTEN RATTENHIRNE

Aus den Gehirnen wurde ein 6 mm messender Block geschnitten - Incisura tentorii bis 6 mm rostral. Diese Segmente wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 %, 96 %, Isopropanol) entwässert, in Toluol lipophilisiert und anschließend in 52 °C (3 d), dann 60 °C (2 d) heißes Paraffin gelegt, in Metallrahmen gebracht, mit 60 °C heißem Paraffin ausgegossen und härteten bei Raumtemperatur aus.

Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Schlittenmikrotom Typ 1208, Leitz, Wetzlar) jeweils zehn 5 µm dünne Hirnschnitte angefertigt. Sie wurden im Warmwasserbad geglättet und auf Objektträger gebracht. Die gewählte Ebene entspricht etwa, korrespondierend zum Hirnatlas von Paxinos und Watson (1986), dem Niveau Bregma -3,6 mm.

2.5.1 CÖLESTINBLAU-SÄUREFUCHSIN-FÄRBUNG

Die Schnitte wurden in (1) Rotihistol® (3 x 5 min) und Isopropanol (5 min) entparaffinisiert, in einer (2) absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %; je 5 min) gebadet, (3) 10 min in einer 1 %igen Cölestinblau-Lösung gefärbt, mit Leitungswasser gespült und anschließend für je 2 min mit (4) Säurefuchsin (1 %ig) gefärbt und in (5) Essigsäure-Lösung (1 %ig) weiterbehandelt. Es folgte die (6) Umkehrung der Schritte 1-3. Die histologischen Schnitte wurden mit Corbit-Balsam behandelt und Deckgläschen aufgesetzt.

Herstellung der Cölestinblau-Lösung (1 %ig):

Ammoniumeisen(II)sulfat 1,0 g
Konz. Salzsäure 0,5 ml
Cölestinblau 1,0 g
Aqua dest. 100 ml

Herstellung der Säurefuchsin-Lösung (1 %ig):

Säurefuchsin 1,0 g
Aqua dest. 100 ml

Herstellung der Essigsäure-Lösung (1 %ig):

Eisessig 1,0 ml
Aqua dest. 100 ml

Die geschädigten Neurone stellen sich mit dieser Färbemethode pyknotisch dar; Säurefuchsin passiert die Zellmembran dieser Neurone (nicht jedoch der Intakten) und färbt die Zellen intensiv rot an. Ungeschädigte Neurone erscheinen durch das Cölestinblau schwach bläulich gefärbt.

2.5.2 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER SCHNITTE

Die quantitative Auswertung der Schnitte erfolgte im Stratum pyramidale des hippocampalen CA1-Bandes mit Hilfe eines Mikroskops (Carl Zeiss Axiostar, Oberkochen) bei 200facher Vergrößerung. Die Differenzierung vom CA3-Band erfolgte nach morphologischen Kriterien (Bayer 1985; Johansen 1993).

Gezählt wurden geschädigte und ungeschädigte Neurone des linken und rechten Hippocampus. Die Ergebnisse wurden arithmetisch gemittelt, und als prozentualer Anteil geschädigter Neurone dargestellt.

Desweiteren wurden lediglich die intakten Neurone ermittelt und als absolute Zahlen dargestellt. Die Ergebnisse aus beiden Zählungen wurden später verglichen.

Alle Erhebungen wurden an Cölestinblau/Säurefuchsin-gefärbtem Gewebe unternommen.

2.6 STATISTIK

Die Protokollierung, Kalkulation und Datenverwaltung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erfolgte auf der Grundlage der Computer-Software Microsoft-Word 2000[®] und Microsoft-Excel 2000[®]. Die deskriptive und analytische Statistik wurde mit SPSS 12.0 durchgeführt. Die verwendeten Grafiken und Tabellen wurden mit Microsoft-Excel 2000[®] und SPSS 12.0 erstellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (S.D.) aus ,n' Versuchen angegeben. Für Gruppenvergleiche wurde zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Für normalverteilte Parameter wurde der Student's t-test angewendet.

Aufgrund der großen Spannweite der Ergebnisse der Zellschädigung wurde neben der Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung der Median und eine graphische Darstellung in Form von Boxplots gewählt. Als Grundlage der Signifikanzbestimmung diente der Rangsummen-basierte Mann-Whitney-U-Test.

Als Signifikanzniveau wurde bei allen durchgeführten Tests $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 EFFEKTE VON BACLOFEN AM MODELL DER TRANSIENTEN GLOBALEN HIRNISCHEMIE DER RATTE

Die hier vorgestellten Ergebnisse basieren auf den experimentell erhobenen Daten der beiden Studienarme *präischämische Applikation* und *postischämische Applikation*, bestehend jeweils aus Verum- und Kontrollgruppe. Dabei wurden in den präischämischen Versuchsreihen 11 Tiere in der Baclofengruppe und 10 Tiere in der Placebogruppe verwendet. In den postischämischen Versuchsreihen wurden jeweils 12 Tiere verwendet. Die Angaben in Klammern entsprechen der jeweiligen Standardabweichung.

3.1.1 EINFLUSS VON BACLOFEN AUF DIE NEURONALE SCHÄDIGUNG DES HIPPOCAMPUS

Nachfolgend sollen die Ergebnisse aus den histologischen Untersuchungen vorgestellt werden. Die erzielte hippocampale Schädigung durch zehnteilige Viergefäßokklusion variierte zwischen den einzelnen Versuchen von nahezu normalen Befunden bis hin zur kompletten ischämischen Schädigung der Pyramidenzellschicht des hippocampalen CA 1-Bandes.

Exemplarisch seien hier einige der Histologien abgebildet (**Abb. 3.1 a,b**):

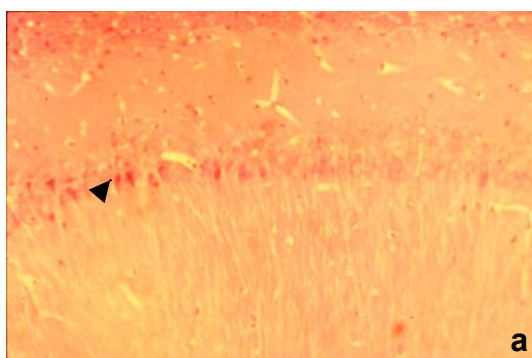


Abb. 3.1a: Darstellung einer moderaten Zellschädigung im CA1-Band in mittlerer Vergrößerung. Deutlich zu erkennen sind die intensiv rot angefärbten, pyknotischen Neurone (Pfeilspitzen).

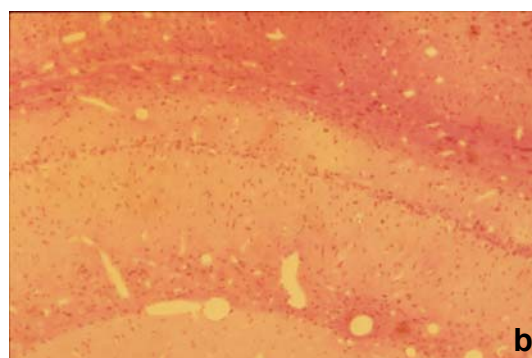


Abb. 3.1 b: Intensive Zellschädigung des Str. pyramidale mit gut sichtbarer Entzündungsreaktion im Str. radiatum und Str. oriens des Hippocampus.

3.1.1.1 PRÄISCHÄMISCHE APPLIKATION

Der prozentuale Anteil der geschädigten Zellen in diesem Studienarm beträgt in der Baclofengruppe im Median 90,3%, in der Kontrollgruppe 34,5% (Mittelwerte: 70,3%, bzw. 43,3%; Standardabweichungen: 35,9, bzw. 32,8 %). Obwohl ein doch deutlicher Unterschied zwischen Verum- und Kontrollgruppe festzustellen ist, lässt sich hier kein signifikanter Effekt darstellen ($p=0,11$) (**Abb.3.2**).

Ein signifikanter Seitenunterschied der absoluten Zellzahlen und der geschädigten Zellen liegt in keiner der Gruppen vor ($p=0,36$, bzw. 0,73).

Das Minimum gemessener Schädigung liegt bei 12,4% in der Baclofengruppe und 10,2% in der Placebogruppe, das Maximum bei 99,2%, bzw. 96,4%. Die sich daraus ergebende Schädigungsbreite lag mit 86,8% und 86,2% sehr nah beieinander. Die Standardabweichung beträgt 35,8%, bzw. 32,9%.

In den Histogrammen (**Abb. 3.3**) lässt sich anschaulich die unterschiedlich gewichtete Schädigungsverteilung der beiden Untersuchungspopulationen darstellen. So findet sich ein reziprokes Verteilungsmuster mit der Gewichtung im Bereich einer hohen Zellschädigung (80-100 %) in der Baclofengruppe (6 von 11 Tieren) sowie der Gewichtung im Bereich einer niedrigen Zellschädigung (0-30 %) in der Kontrollgruppe (5 von 10 Tieren).

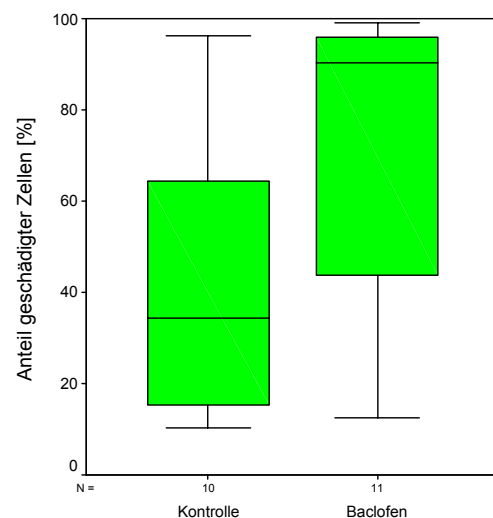


Abb. 3.2: Zellschädigung [%] nach präischämischer Baclofenapplikation. Aufführung der Boxplots.

a

b

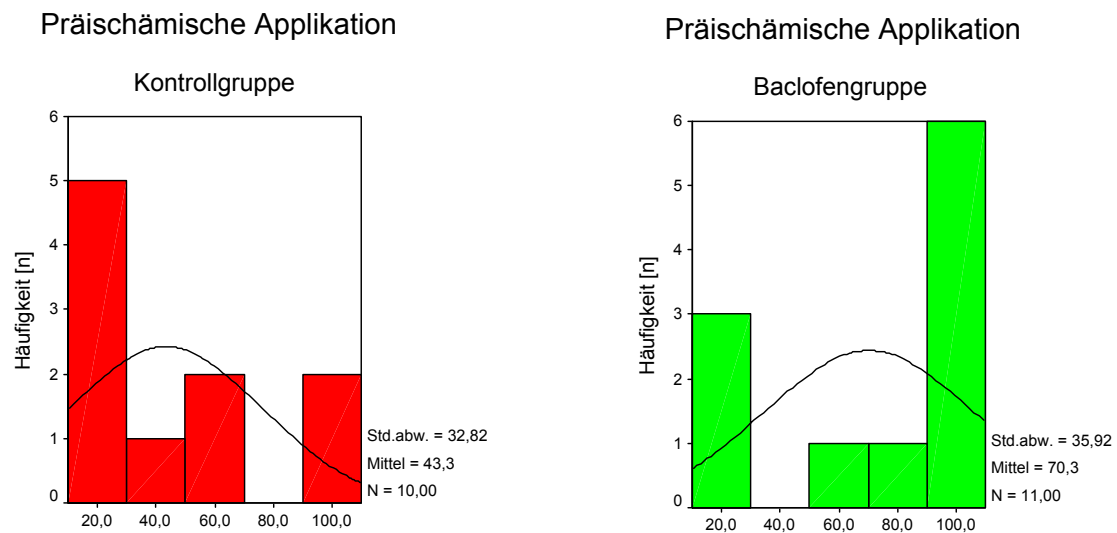


Abb. 3.3 a, b: Histogramme der Zellschädigungsverteilung [%] in der präischämischen Versuchsgruppe.

3.1.1.2 POSTISCHÄMISCHE APPLIKATION

Der Anteil der geschädigten Zellen beträgt im Median 40,8 % im Baclofenarm, versus 47,0 % im Kontrollarm (**Abb. 3.4**). Der Mittelwert des Anteils der geschädigten Zellen beträgt 42,4 % in der Baclofen-, bzw. 55,6 % in der Kontrollgruppe (Standardabweichung 29,7 %, bzw. 33,8 %).

Es lässt sich hier kein signifikanter Gruppenunterschied darstellen ($p=0,35$).

Ein signifikanter Seitenunterschied der gezählten absoluten Zellzahlen liegt auch

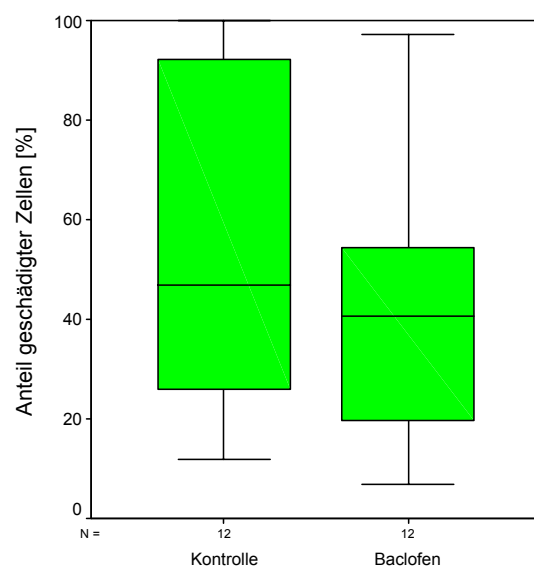


Abb. 3.4: Zellschädigung [%] nach post-ischämischer Baclofenapplikation. Aufführung der Boxplots.

in diesem Punkt nicht vor ($p=0,41$).

Die ermittelte Schädigungsbreite ist mit 90 % in der Baclofengruppe gegenüber 88 % in der Kontrollgruppe ähnlich groß, bei einer minimalen Schädigung von 7 % bei den mit Baclofen behandelten Tieren und 11,9 % bei den Kontrolltieren. Die maximale Höhe der Zellschädigung beträgt 97 %, bzw. 100 %.

Betrachtet man die Histogramme (**Abb. 3.5**) so zeigt sich in der Verumgruppe ein Schädigungsmuster, welches im Bereich einer mittleren Schädigungsintensität (30-70 %) angesiedelt ist (5 von 12 Tieren). In der Placebogruppe findet sich ein zweigipfliges Verteilungsmuster mit den Schwerpunkten zwischen 70 und 100% ($n=5$) und 0 und 30 % ($n=4$).

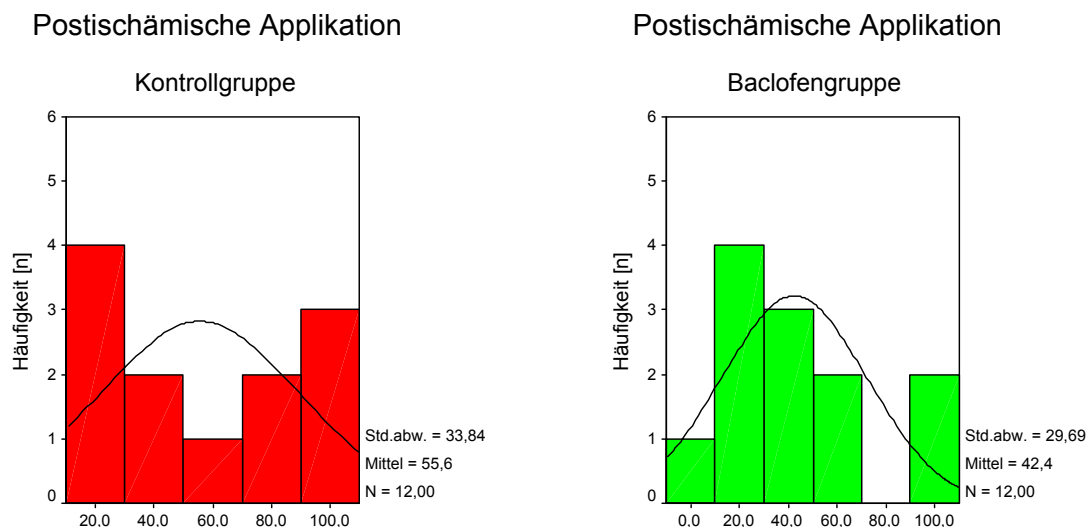


Abb. 3.5 a, b: Histogramme der Zellschädigungsverteilung [%] in der postischämischen Versuchsgruppe.

3.1.2 EINFLUSS VON BACLOFEN AUF PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

Hier sollen die während der Experimente erhobenen physiologischen Einflussgrößen Temperatur (Körperkern- und Kopftemperatur), Blutglukose, arterieller Blutdruck, arterielle Sauerstoffsättigung, arterielle Kohlendioxidsättigung sowie der arteriell gemessene pH-Wert dargestellt werden.

3.1.2.1 PRÄISCHÄMISCHE APPLIKATION

3.1.2.1.1 TEMPERATUR

Zur Vermeidung temperatur-bedingter Einflüsse auf die Ergebnisse der cerebralen Ischämie wurde eine mittlere Körperkerntemperatur (KKT) von 37°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) in den Versuchsgruppen angestrebt. Dieser Messparameter wurde kontinuierlich überwacht und zu definierten Zeitpunkten festgehalten (**Abb. 3.6**).

Die größte mittlere Schwankung um 37°C beträgt $-0,3^{\circ}\text{C}$ zu den

Zeitpunkten T2 in der Baclofengruppe und T3 in der Kontrollgruppe. Der größte Unterschied zwischen den Armen beträgt ebenfalls $0,3^{\circ}\text{C}$ zum Zeitpunkt T4 (Ende der 4-Gefäß-Okklusion). Der durchgeführte T-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zur Ermittlung der kranialen Temperatur wurde vor Beginn der cerebralen Ischämie eine Nadelelektrode unter der Kopfhaut der Versuchstiere angebracht und bis nach Abschluß der cerebralen Ischämie belassen. Das System wurde über einen Rückkopplungsmechanismus mit einer Heizlampe verbunden. Der angestrebte Sollwert beträgt auch hier 37°C .

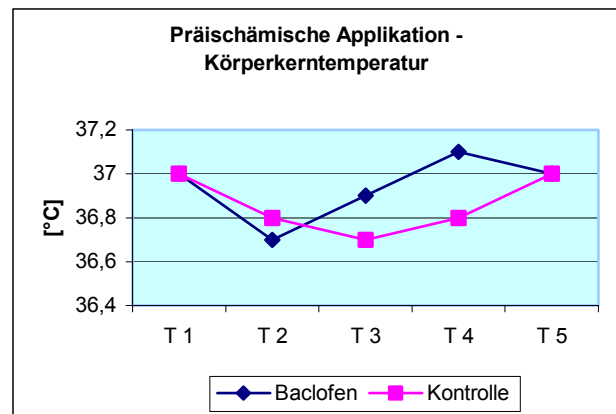


Abb.3.6: Mittleren Temperaturverlauf der Körperkerntemperatur zu den Zeitpunkten T1 (Versuchsbeginn), T2 (Beginn 4VO), T3 (5' 4VO), T4 (Ende 4VO) und T5 (Versuchsende)

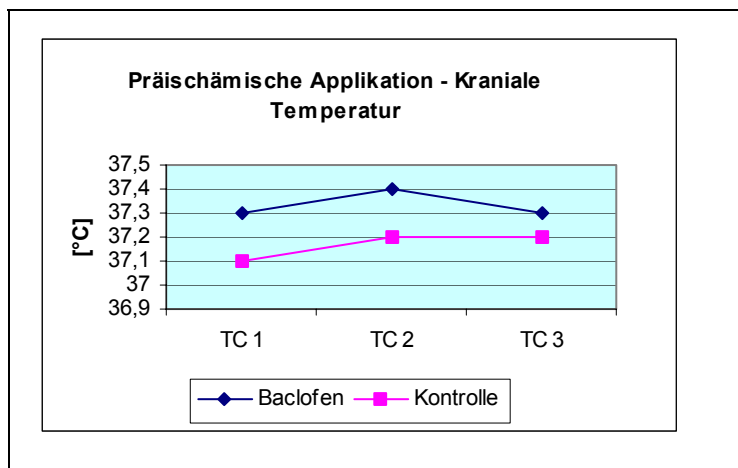


Abb. 3.7: Mittlerer Temperaturverlauf der kranialen Temperatur zu den Zeitpunkten TC1 (vor 4 VO), TC2 (5' 4VO) und TC3 (Ende 4VO).

Die größte mittlere Abweichung vom Sollwert beträgt $0,4^{\circ}\text{C}$ zum Zeitpunkt TC2 (5min 4-Gefäß-Okklusion) in der Baclofengruppe und $0,2^{\circ}\text{C}$ in der Kontrollgruppe (TC2 & 3). Die größte Differenz zwischen den Armen beträgt $0,2^{\circ}\text{C}$ (TC1 und 2; $p>0,05$) (**Abb. 3.7**).

3.1.2.1.2 BLUTGLUKOSESPIEGEL

Der aus der Entnahme arterieller Blutproben erzielte Serumglukosespiegel zu Beginn und zum Ende der Versuche zeigte in den initial untersuchten Proben mit mittleren Werten von 109 mg/dl ($\pm 19,6$) in der Kontrollgruppe sowie 126 mg/dl (± 16) in der Baclofengruppe überraschenderweise große gruppenspezifische Abweichungen ($p<0,05$). Die gegen Ende der Versuche ermittelten Werte von 110 mg/dl im Kontrollarm und 121 mg/dl im Baclofenarm ($\pm 22,4$, bzw. $23,7$) glichen sich geringfügig gegeneinander an und zeigten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Armen.

3.1.2.1.3 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK

Der mittels Kanülierung der linken A. femoralis gemessene mittlere arterielle Blutdruck (MABD) wurde kontinuierlich abgeleitet und zu definierten Zeitpunkten festgehalten (**Abb. 3.8**).

Eingangs zeigten sich nahezu identische mittlere Blutdruckwerte von 93 mmHg in der Baclofengruppe gegenüber 94 mmHg in der Kontrollgruppe (± 11 , bzw. $\pm 11,7$),

die jedoch unmittelbar nach Medikamentenapplikation in der Verumgruppe auf 75,2 mmHg ($\pm 18,0$) abfielen, und in der Kontrollgruppe mit 90 mmHg ($\pm 12,8$) relativ stabil blieben ($p < 0,05$). Dieser medikamentenbedingte Effekt ist nur kurzfristig gewesen, und bereits zu Beginn der 4-Gefäß-Okklusion wieder aufgehoben. Zu diesem Zeitpunkt lagen der MABD in der Verumgruppe bei durchschnittlich 115,2 mmHg ($\pm 19,9$) und in der Kontrollgruppe bei 113,6 mmHg ($\pm 10,5$). Während der ischämischen Phase blieben die MABDs in beiden Gruppen weitgehend konstant, um nach Beendigung der Ischämie übermäßig stark abzufallen. Dabei ist die postischämische Blutdruckreduktion bei im Mittel 76,4 mmHg ($\pm 23,5$) in der Baclofengruppe gegenüber 86,8 mmHg ($\pm 19,8$) in der Kontrollgruppe ausgeprägter, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zu erzielen ($p = 0,3$). Die zum Ende der Versuche unternommenen Blutdruckmessungen zeigten einen Anstieg in der Verumgruppe auf durchschnittlich 87,6 mmHg ($\pm 14,1$), gegenüber einem Abfall in der Kontrollgruppe auf 80 mmHg ($\pm 15,9$).

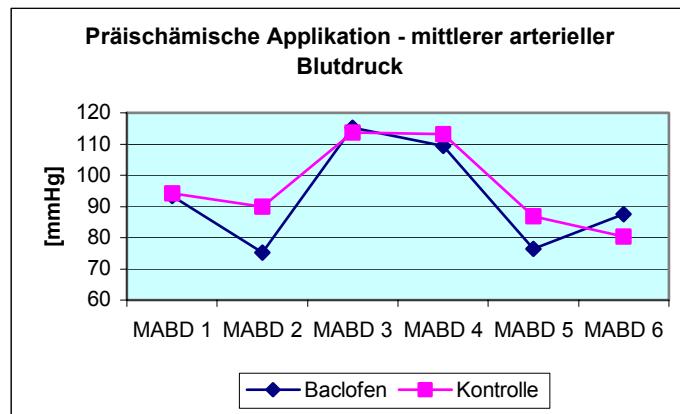


Abb. 3.8: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes. MABD 1 (Versuchsbeginn), MABD 2 (post applicationem), MABD 3 (Beginn 4VO), MABD 4 (5' 4VO), MABD 5 (nach 4VO) und MABD 6 (Versuchsende).

3.1.2.1.4 SAUERSTOFFPARTIALDRUCK, KOHLENDIOXIDPARTIALDRUCK UND PH-WERTE DES BLUTES

Zur Untersuchung von pO_2 , pCO_2 und der pH-Werte während der Experimente wurden arterielle Blutproben zu definierten Zeitpunkten (**Abb. 3.9, 3.10 und 3.11**) gewonnen und mittels eines Blutgasanalysators ausgewertet.

Der Ausgangswert für den Sauerstoffpartialdruck betrug in der Baclofengruppe im Mittel 156 mmHg ($\pm 20,8$), in der Kontrollgruppe 163 mmHg ($\pm 15,9$), und nahm zum Ende der Versuche auf 123 mmHg ($\pm 20,1$), bzw. 129 mmHg ($\pm 22,8$) kontinuierlich ab (**Abb. 3.9**). Dabei ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede.

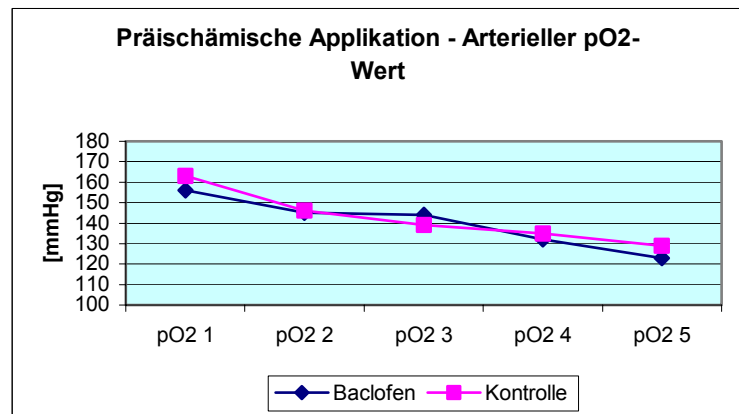


Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes. pO2 1 (Versuchsbeginn), pO2 2 (Beginn 4VO), pO2 3 (5' 4VO), pO2 4 (nach 4VO) und pO2 5 (Versuchsende).

Während die initial gemessenen Kohlendioxidpartialdrucke bei im Mittel 43 mmHg ($\pm 6,18$) in der Baclofengruppe und 41 mmHg ($\pm 4,66$) in der Kontrollgruppe ähnliche Ausgangswerte zeigten, konnte nach Baclofenapplikation ein deutlicher Anstieg des pCO_2 auf 52 mmHg ($\pm 8,72$) verzeichnet werden, wohingegen der in der Kontrollgruppe gemessene durchschnittliche Wert mit 41 mmHg ($\pm 6,17$) stabil blieb. Die Untersuchung auf Signifikanz mit dem Student's T-Test stellte ein Niveau von $p = 0,003$ fest.

Im Verlauf der Untersuchungen stieg der durchschnittliche pCO_2 in der Verumgruppe, bei relativer Stabilisierung während der Ischämie-phase, auf einen Endwert von 62 mmHg ($\pm 17,84$) an. In der Kontrollgruppe kam es ebenfalls zu einer Hyperkapnie mit einem

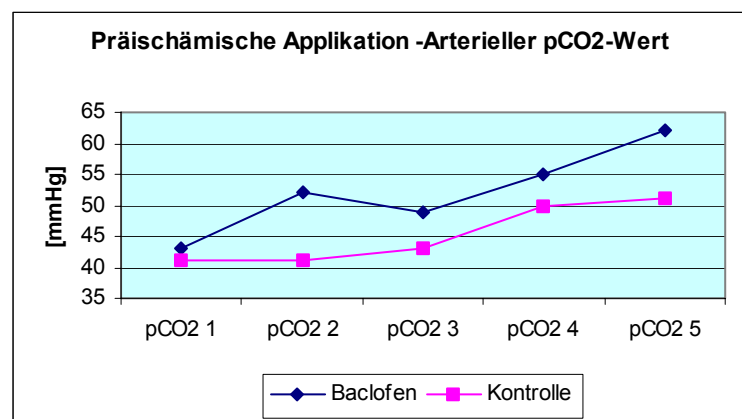


Abb. 3.10: Verlauf des mittleren Kohlendioxidpartialdruckes. pCO2 1 (Versuchsbeginn), pCO2 2 (Beginn 4VO), pCO2 3 (5' 4VO), pCO2 4 (nach 4VO) und pCO2 5 (Versuchsende).

Anstieg des pCO_2 bis auf 51 mmHg ($\pm 5,74$) während der letzten Messung (**Abb. 3.10**). Diese fiel jedoch wesentlich moderater aus. Die Untersuchung auf Signifikanz ergab mit einem Niveau von $p = 0,07$ keine signifikanten Gruppenunterschiede mehr.

Die durch die Messung des pH-Wertes gewonnenen Ergebnisse spiegeln die Resultate des pCO₂-Monitorings quasi reziprok wieder. Die initial gemessenen Werte lagen mit 7,41 ($\pm 0,05$) in der Baclofengruppe, gegenüber 7,39 ($\pm 0,02$) in der Kontrollgruppe dicht beieinander. Nach Baclofengabe sank der Wert dabei auf 7,3 ($\pm 0,05$), während er in der Kontrollgruppe mit 7,38 ($\pm 0,04$) annähernd gleich blieb ($p = 0,01$). Dabei zeigte sich auch hier eine Stabilisierung während der Durchführung der Ischämie mit einem Absinken der Werte in beiden Gruppen während der Nachbeobachtungsphase auf zuletzt 7,28 ($\pm 0,05$), bzw. 7,33 ($\pm 0,04$) ($p = 0,02$).

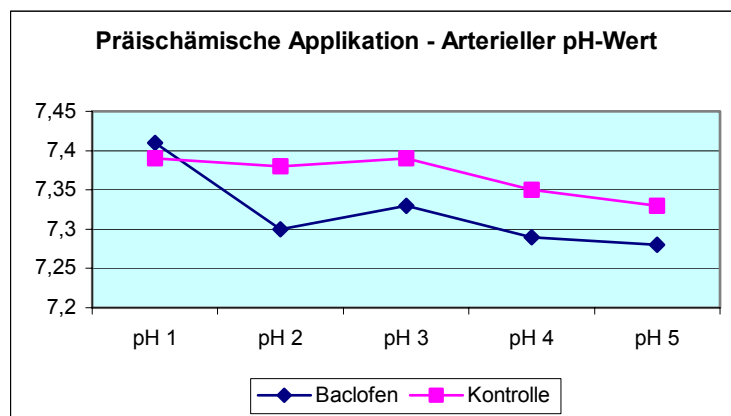


Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der pH-Wertmessung. pH 1 (Versuchsbeginn), pH 2 (Beginn 4VO), pH 3 (5' 4VO), pH 4 (nach 4VO) und pH 5 (Versuchsende).

3.1.2.2 POSTISCHÄMISCHE APPLIKATION

3.1.2.2.1 TEMPERATUR

Bezüglich der angestrebten Temperatur galten in der postischämischen Versuchsgruppe die gleichen Bedingungen wie in der präischämischen Versuchsgruppe. Die zu Beginn gemessene Körperkerntemperatur betrug in beiden Gruppen 36,9 °C ($\pm 0,3$, bzw. $\pm 0,26$) und blieb während der Versuche im Mittel innerhalb der Toleranz von $\pm 0,5$ °C (**Abb. 3.12**).

Gleiches gilt für die ermittelte kraniale Temperatur, welche in der Baclofengruppe anfangs im Mittel bei 37,2 °C ($\pm 0,14$) lag, und in der Kontrollgruppe im Mittel bei 37,3 °C ($\pm 0,19$). Die größte gemessene Abweichung betrug hier 0,1 °C (TC 1, TC 2) (**Abb. 3.13**).

Die Anwendung des Student's T-Tests erbrachte dabei keinen Hinweis auf signifikante Gruppenunterschiede.

Abb. 3.12: Verlauf der mittleren Körperkerntemperatur. T 1 (Versuchsbeginn), T 2 (Beginn 4VO), T 3 (5' 4VO), T 4 (nach 4VO) und T 5 (Versuchsende).

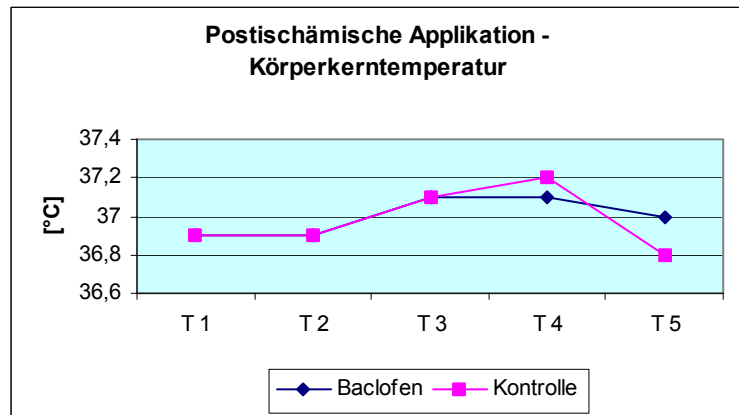
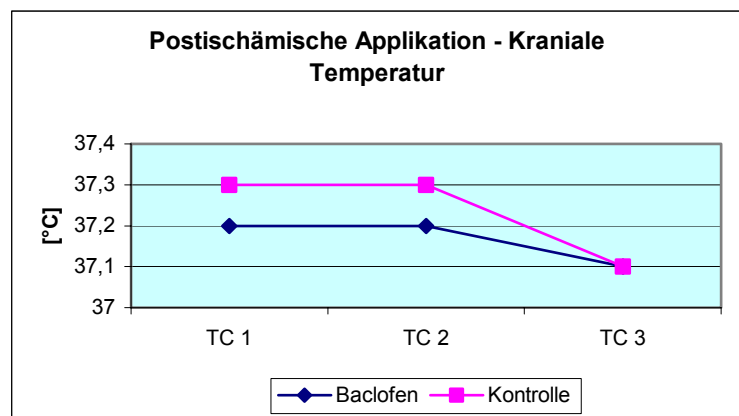


Abb. 3.13: Verlauf der mittleren Körperkerntemperatur. TC 1 (Beginn 4VO), TC 2 (5' 4VO), TC 3 (nach 4VO).



3.1.2.2.2 BLUTGLUKOSESPIEGEL

Wie auch im präischämischen Versuchsarm zeigten sich hier bei den initial ermittelten Blutglukosewerten mit 113 mg/dl ($\pm 17,2$) gegenüber 96 mg/dl ($\pm 18,0$) geringfügig höhere Werte bei den mit Baclofen behandelten Tieren ($p = 0,03$). Dieser Unterschied nahm zum Versuchsende hin ab, wobei er bei den Kontrolltieren mit im Mittel 93 mg/dl ($\pm 21,4$) gegenüber 106 mg/dl ($\pm 15,5$) stabiler erscheint. Ein signifikantes Niveau konnte dabei nicht mehr nachgewiesen werden.

3.1.2.2.3 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK

Die Ausgangsmessungen des MABD waren in beiden Gruppen mit 94 mmHg ($\pm 8,6$) bei den mit Baclofen behandelten Tieren und 93 mmHg ($\pm 11,9$) in der Kontrollgruppe nahezu identisch. Dies setzte sich bis zur Baclofenapplikation weiter fort.

Anschließend sank der MABP vorübergehend auf 74 mmHg ($\pm 12,8$) ab. In der Kontrollgruppe betrug der MABP zu diesem Zeitpunkt 99 mmHg ($\pm 20,8$) ($p=0,03$). Dieser Effekt hielt, ähnlich dem im präischämischen Versuchsarm beobachteten, jedoch nur kurze Zeit an. Während der letzten Messung (MABD 6) zeigten sich zwar mit 89 mmHg vs. 98 mmHg ($\pm 18,0$, bzw. $\pm 15,3$) noch immer Gruppenunterschiede ($p>0,05$) (**Abb. 3.14**).

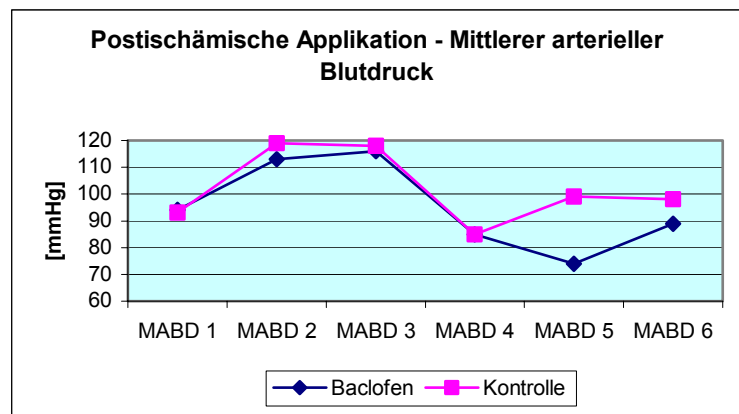


Abb. 3.8: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes. MABD 1 (Versuchsbeginn), MABD 2 (Beginn 4VO), MABD 3 (5' 4VO), MABD 4 (nach 4VO), MABD 5 (post applicationem) und MABD 6 (Versuchsende).

3.1.2.2.4 SAUERSTOFFPARTIALDRUCK, KOHLENDIOXIDPARTIALDRUCK UND PH-WERTE DES BLUTES

Die Messungen des pO_2 zeigten, vergleichbar der präischämischen Versuchsreihe, relativ ähnliche Ausgangswerte mit 176 mmHg ($\pm 22,4$) in der Baclofengruppe und 161 mmHg ($\pm 13,1$) in der Kontrollgruppe. Die Werte fielen in beiden Gruppen während der Messungen konstant ab, um zum Ende der Versuche wieder leicht anzusteigen (**Abb. 3.15**). Die zuletzt ermittelten durchschnittlichen Werte betragen in beiden Gruppen jeweils 154 mmHg ($\pm 20,4$, bzw. $\pm 20,8$) ($p>0,05$).

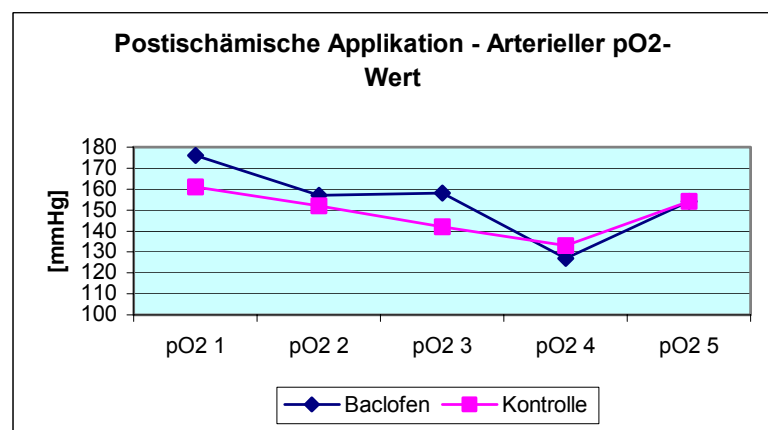


Abb. 3.15: Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes. pO2 1 (Versuchsbeginn), pO2 2 (Beginn 4VO), pO2 3 (5' 4VO), pO2 4 (nach 4VO) und pO2 5 (Versuchsende).

Während bei den ermittelten Ergebnissen des Kohlendioxidpartialdruckes und des pH-Wertes in der präischämischen Versuchsgruppe deutliche Gruppenunterschiede mit dem Bild einer respiratorischen Azidose, v.a. bei den mit Baclofen behandelten Tieren zu verzeichnen waren, blieben die erhobenen Daten der mittleren $p\text{CO}_2$ -Werte und der mittleren pH-Werte im postischämischen Versuchsarm weitgehend ohne signifikante Gruppenunterschiede. Lediglich zum Messzeitpunkt $p\text{CO}_2$ 2 (vor Okklusion) zeigten die Tiere in der Baclofengruppe mit durchschnittlich 48 mmHg ($\pm 5,1$) gegenüber 41 mmHg ($\pm 7,0$) in der Kontrollgruppe einen signifikant erhöhten durchschnittlichen $p\text{CO}_2$ -Wert ($p=0,005$), der im Verlauf während der Okklusionsphase wieder abfiel, um in beiden Gruppen anschließend gemäßigt auf mittlere Werte von 49 mmHg ($\pm 5,2$) (Baclofen), bzw. 50 mmHg ($\pm 12,2$) (Kontrollen) anzusteigen (**Abb. 3.16**).

Die Auftragung der pH-Werte stellt dabei ein ähnliches Muster dar, welches im Normbereich liegende Ausgangswerte anzeigte, die während der Ischämiephase in beiden Gruppen stabil blieben, um im weiteren Verlauf stetig abzunehmen, ohne jedoch signifikante gruppenspezifische Unterschiede zu zeigen (**Abb. 3.17**).

Abb. 3.17: Zeitlicher Verlauf der pH-Wertmessung. pH 1 (Versuchsbeginn), pH 2 (Beginn 4VO), pH 3 (5' 4VO), pH 4 (nach 4VO) und pH 5 (Versuchsende).

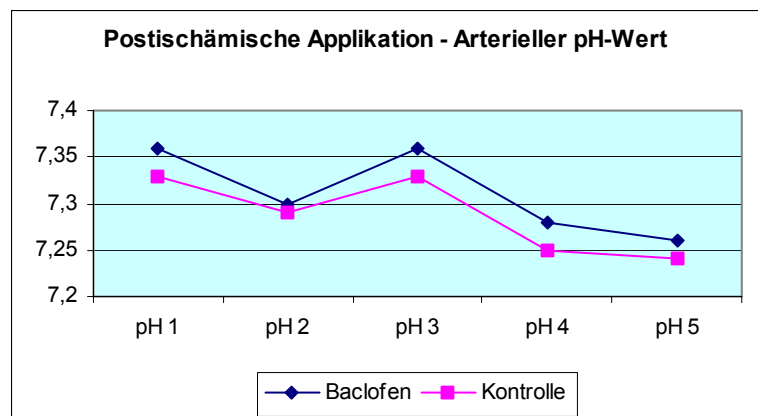
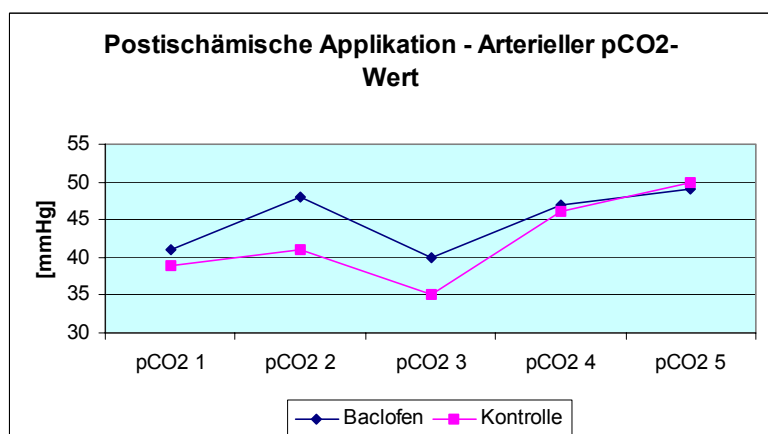


Abb. 3.16: Zeitlicher Verlauf des Kohlendioxidpartialdruckes. $p\text{CO}_2$ 1 (Versuchsbeginn), $p\text{CO}_2$ 2 (Beginn 4VO), $p\text{CO}_2$ 3 (5' 4VO), $p\text{CO}_2$ 4 (nach 4VO) und $p\text{CO}_2$ 5 (Versuchsende).



3.2 MODELLEVALUATION

Zur Beurteilung der Ausprägung der ischämischen Zellschädigung in Abhängigkeit der Ischämiezeit wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Es wurden die Schädigungsintervalle 6 (n=8), 8 (n=8), 10 (n=11) und 15 min (n=6) gewählt.

Die ausgeprägteste Zellschädigung wurde mit im Median 71% (Mittelwert 63,3 %; Standardabweichung 26,6 %) bei den mit 15 min Ischämiezeit behandelten Tieren beobachtet. Die Höhe der Zellschädigung nahm im Zeitverlauf erwartungsgemäß ab, wobei in der Gruppe der mit 10 min Ischämiezeit behandelten Tiere die mediane Schädigung 49% (Mittelwert 54,7; Standardabweichung 23,7) betrug. Nach 6, bzw. 8 min globaler Ischämie ließen sich keine signifikanten Gruppenunterschiede mehr verzeichnen. Die mediane Schädigung mit 51%, bzw. 35,5% zeigte hier zwar scheinbar deutliche Abstände, es offenbarten sich jedoch gerade beim Vergleich der Mittelwerte (43,8% vs. 41,6%; Standardabweichung 22,5, bzw. 32,5) keine auffallenden Unterschiede mehr ($p=0,46$). Jedoch zeigte schon der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Versuchsgruppen der mit 8 und 10 min Ischämiezeit verwendeten Tiere signifikante Gruppenunterschiede auf ($p=0,005$).

3.3 ZUSAMMENFASSUNG

1. Baclofen zeigte im präischämischen Applikationsmodus eine im Median deutlich höhere Zellschädigung, gemessen als Anteil geschädigter Zellen in Prozent, gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Effekt stellte sich nicht signifikant dar, wies jedoch einen deutlichen Trend auf ($p = 0,1$).
2. In dem postischämischen Applikationsmodus wiesen beide Versuchsgruppen eine annähernd ausgeglichene Schädigungsstärke ohne signifikante Gruppenunterschiede auf.
3. Baclofen erzeugte in beiden Versuchsarmen eine kurzzeitige signifikante Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks.
4. Die mit Baclofen behandelten Tiere zeigten, verglichen mit den Kontrolltieren, im präischämischen Versuchsarm nach Applikation des Medikamentes eine Neigung zur Hyperkapnie und respiratorischen Azidose. Dieser Effekt ließ sich im postischämischen Versuchsarm nicht nachweisen.
5. In beiden Versuchsarmen zeigte sich in den Baclofengruppen ein signifikant erniedrigter initialer Blutglukosespiegel.
6. Das in der vorliegenden Studie verwendete und etablierte Tiermodell lieferte reproduzierbare Ergebnisse, deren Schädigungsintensität mit der Dauer des Ischämieintervalls zunahm.

3.4 TABELLARISCHE GEGENÜBERSTELLUNG DER BEIDEN VERSUCHSARME

		Präischämische Applikation			Postischämische Applikation		
		Baclofen	Kontrollen		Baclofen	Kontrollen	
		(n = 11)	(n = 10)	p	(n = 12)	(n = 12)	p
Zellschädigung [%]		90,3±32,8	34,5±35,9	0,1	40,8±29,7	47,0±33,8	
MABD 1	[mmHg]	93,3±11,8	94,2±11,0		93,8±8,6	95,6±11,9	
MABD 2		75,2±18,0	90±12,8	0,045	113,5±9,5	117,6±12,9	
MABD 3		115,2±19,6	113,6±10,5		116,4±13,9	110,4±19,7	
MABD 4		109,4±21,2	113,2±15,7		85,8±10,5	77,7±12,5	
MABD 5		76,4±23,5	86,8±19,8		74,3±12,8	94,1±20,3	0,03
MABD 6		87,6±14,2	80,4±15,9		88,5±17,9	97,9±15,2	
T 1	[°C]	37,0±0,2	37,0±0,4		36,9±0,3	37,0±0,3	
T 2		36,7±0,4	36,8±0,4		36,9±0,2	36,9±0,3	
T 3		36,9±0,4	36,7±0,5		37,1±0,2	37,1±0,3	
T 4		37,1±0,4	36,8±0,5		37,1±0,1	37,2±0,4	
T 5		37,0±0,3	37,0±0,2		37,0±0,2	36,8±0,4	
TC 1	[°C]	37,3±0,2	37,1±0,4		37,2±0,1	37,3±0,2	
TC 2		37,4±0,3	37,2±0,4		37,2±0,1	37,3±0,2	
TC 3		37,3±0,2	37,2±0,2		37,1±0,1	37,1±0,1	
Glu 1	[mg/dl]	126,2±16,7	109,8±20,6	0,045	114,4±18,0	85,4±17,2	0,03
Glu 2		120,7±23,7	109,9±22,4		104,1±15,5	93,4±21,4	
pH 1		7,41±0,05	7,39±0,02		7,36±0,1	7,33±0,08	
pH 2		7,3±0,05	7,38±0,05	0,01	7,3±0,08	7,29±0,1	
pH 3		7,33±0,07	7,39±0,03	0,012	7,36±0,07	7,33±0,05	
pH 4		7,29±0,05	7,35±0,03		7,28±0,1	7,25±0,1	
pH 5		7,28±0,05	7,33±0,04	0,02	7,26±0,06	7,24±0,2	
pO2 1	[mmHg]	155,9±20,8	163,3±15,9		175,7±22,4	168,5±13,7	
pO2 2		144,7±23,5	146,3±28,2		157,3±13,8	158,5±19,3	
pO2 3		144,4±21,2	138,8±35,1		157,6±16,8	141,8±25,2	
pO2 4		131,9±23,4	134,8±28,2		126,8±21,1	128,4±19,9	
pO2 5		123,4±20,1	129,4±22,8		153,9±20,4	156,7±20,8	
pCO2 1	[mmHg]	42,6±22,8	41,1±4,7		41,3±5,1	38,1±3,7	
pCO2 2		51,9±8,7	41,1±6,2	0,03	48,2±5,1	41,8±7,0	0,005
pCO2 3		48,6±8,4	42,7±3,1	0,1	40,2±7,9	37,3±7,1	
pCO2 4		54,6±6,1	49,5±6,7	0,1	47,1±6,1	46,5±6,2	
pCO2 5		62,1±17,8	50,8±5,7	0,1	49,0±5,2	50,5±12,2	

Anmerkung zu Tabelle 1:

Die mit ‚1‘ gekennzeichneten Variablen des MABD entsprechen in beiden Versuchsräumen den Ausgangsmessungen. In der präischämischen Versuchsgruppe entsprechen die mit ‚2‘ gekennzeichneten Variablen dem Zeitpunkt unmittelbar nach Medikamentenapplikation. Der dritte Wert entspricht dem kurz nach Beginn der Gefäßokklusion erhobenen Wert. Die Werte ‚4‘ und ‚5‘ kennzeichnen die Zeitpunkte 5‘ nach Okklusion und kurz nach Okklusionsende. ‚6‘ stellt den am Versuchsende gemessenen Wert dar. Die Parameter Temperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck sind zu fünf Zeitpunkten erhoben. Dabei entsprechen sie den MABD-Messintervallen. Es entfällt die Messung nach Medikamentenapplikation.

Ähnlich ist das Schema in der postischämischen Versuchsgruppe. Hier entspricht der Wert ‚5‘ in der MABD-Messung und der Wert ‚4‘ der Temperatur-, Sauerstoffpartialdruck- und Kohlendioxidpartialdruckmessung dem nach Medikamentenapplikation erhobenen Wert.

Die Messung der kranialen Temperatur wurde in beiden Versuchsgruppen nur intraschämisch erhoben. Der Serumglukosespiegel wurde zu Beginn und am Ende der Versuche bestimmt.

4. Diskussion

Die Suche nach Substanzen, die geeignet sind in den Pathomechanismus der cerebralen Ischämie – global oder fokal – einzugreifen, hat in den letzten Jahren zu erheblichen wissenschaftlichen Bemühungen geführt. Dabei gelangen häufig Kleintiermodelle, insbesondere an Ratten, zum Einsatz. Dies besonders aufgrund der Verfügbarkeit, der Kosteneffektivität und der – gegenüber Großtiermodellen – erhöhten ethischen Akzeptanz (Block 1999; Ginsberg 1989).

Kleintiermodelle zur Erforschung der cerebralen Ischämie gehören seit ca. drei Jahrzehnten zu einem festen Instrument in der medizinischen Wissenschaft (Block 1999). Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei Schädigungsmechanismen:

1. die fokale cerebrale Ischämie und
2. die globale cerebrale Ischämie

Während Versuche an Modellen der fokalen cerebralen Ischämie im wesentlichen thrombo-embolische Infarkte simulieren, die nur einen Teil des Gehirns - meist die von der Arteria cerebri media versorgten Areale - betreffen, wird bei den Modellen der globalen cerebralen Ischämie versucht, einen kurzzeitigen cerebralen Perfusionsstillstand, oder zumindest eine hochgradige Perfusionsminderung, zu erzielen. Dabei werden überwiegend in besonders ischämieempfindlichen Arealen des Gehirns, z. B. in Teilen der Hippocampus-Formation, Schädigungen erzeugt.

4.1 DISKUSSION DER METHODIK

Anders als der ‚Gerbil‘ (*Meriones unguiculatus*), dessen cerebrale Durchblutung durch einen anlagegemäß nicht vorhandenen *Circulus arteriosus* ausschließlich über die *Arteriae carotides* gewährleistet ist (Levine und Payan 1966), verfügt die Ratte über ein intaktes Netz kommunizierender Arterien im Bereich der Schädelbasis, welches eine suffiziente Durchblutung bei Okklusion der vorderen oder hinteren hirnversorgenden Gefäße gewährleistet (Corbett 1998). Aufgrund dieser guten Kollateralisation ist zum Erzielen einer ausreichenden Perfusionsminderung im Bereich des Großhirns die Unterbindung des vorderen und des hinteren Hirnkreislaufs notwendig. Dies kann grundsätzlich über zwei unterschiedliche Wege erreicht werden.

Zum einen besteht die Möglichkeit der Unterbindung aller vier hirnversorgenden Arterien in einem Vier-Gefäß-Okklusionsmodell. Dabei erfolgt der zeitweise Verschluss der Carotiden in Verbindung mit der permanenten (Pulsinelli-Modell) oder transienten Okklusion der Vertebralarterien (hier etabliertes Modell). Ein weiterer Weg zur Erzeugung einer suffizienten globalen Großhirnischämie kann mit dem Zwei-Gefäß-Okklusionsmodell erzielt werden. Hierbei werden ebenfalls die Carotiden zeitweise verschlossen. Die eigentliche Ischämie wird jedoch durch eine medikamentös herbeigeführte kurzzeitige systemische arterielle Hypotension induziert (Smith et al. 1984a).

Pulsinelli und Brierley publizierten 1979 erstmals ein Vier-Gefäß-Modell zur Untersuchung der globalen Ischämie. Dabei wurden die Tiere am ersten Tag narkotisiert. Über einen dorsalen Zugang zur Halswirbelsäule wurden die Arteriae vertebrales auf Höhe des Atlas über die Foramina alaria mittels unipolarer Stromeinwirkung verschlossen. Am nächsten Tag erfolgte dann über einen ventralen Zugang zu den Arteriae carotides communes deren zeitweiser Verschluss bei der nicht narkotisierten Ratte (Pulsinelli und Brierley 1979).

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Ischämiemodell stellt insofern eine Modifikation des oben beschriebenen Modells dar, als dass der Zugang zur Halswirbelsäule und den Arteriae vertebrales unter Sicht und von vorn erfolgt. Ferner wurden die Experimente jeweils am gleichen Tag und in Narkose durchgeführt.

Die in beiden Kontrollgruppen bei zehnminütiger Ischämiezeit erzielten mittleren Zellschädigungen betragen 43,3 % im präischämischen Versuchszweig und 52,8 % im postischämischen Arm. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchspopulationen besteht nicht. Damit liegen die hier erzielten Ergebnisse in einem vergleichbaren Rahmen bisher veröffentlichter Resultate bei zehnminütiger Ischämiezeit (Pulsinelli und Brierley 1979; Gionet et al. 1991; Nunn et al. 1994). Allerdings variiert die Schwere der ischämischen Zellschädigung bei gleicher Ischämiezeit mitunter deutlich. So werden am Zweigefäßmodell mit systemischer Hypotension bei zehnminütiger Ischämiedauer Schädigungen von 60 % (Voll et al. 1989), 80-90 % (Auer et al. 1989), bis hin zu über 90 % (Green et al. 1995) beobachtet. Beim Viergefäßmodell zeigen sich ähnliche Schwankungen, die bei

zehnminütiger Ischämiedauer von etwa 40-50 % (Pulsinelli und Brierley 1979) bis hin zu einer etwa 70 % Schädigung (Nelson et al. 1997) reichen.

Die Schwere der neuronalen Schädigung im Bereich des CA1-Bandes ist darüberhinaus auch abhängig von der Dauer der Ischämie. Gewöhnlich werden Ischämiezeiten zwischen 10 und 30 Minuten gewählt. Generell zeigt sich bei der Ermittlung der ischämischen Schädigung im Bereich des hippocampalen CA1-Bandes eine große Streuung. Dabei variiert die Schädigungsintensität in der vorliegenden Untersuchung im präischämischen Versuchsarm zwischen 10 % und 96 %, im postischämischen Versuchsarm zwischen 11 % und 100 %. Dieses Phänomen ist bekannt und wird sowohl beim Vier-Gefäß-Modell als auch beim Zwei-Gefäß-Modell beobachtet (Auer et al. 1989; Li und Buchan 1993; Nellgard und Wieloch 1992). Eine Erklärung hierfür liefert die Erkenntnis, dass ein geringer Blutfluss selbst unter Ischämiebedingungen bei beiden Varianten vorhanden ist. Dieser beträgt beim Modell der Zwei-Gefäß-Okklusion mit systemischer Hypotension etwa 1 % (Smith et al. 1984) und bei dem Vier-Gefäß-Modell etwa 3 % (Pulsinelli et al. 1982) der normalen Hirndurchblutung. Diskutiert werden hier zum einen extracraniale, zum anderen spinale Kollaterale, welche das Gehirn während der Okklusion weiterhin basal mit Blut versorgen (Pulsinelli und Buchan 1988). Als weitere Einflussfaktoren seien die Hirntemperatur und der Blutglukosespiegel genannt. Diese werden aufgrund ihrer Bedeutung gesondert behandelt.

Die globale Hirnischämie führt bei den oben genannten Tiermodellen in Abhängigkeit der gewählten Ischämiezeit zu Schädigungen in diversen Hirnregionen. Smith und Kollegen zeigten, daß diese Schädigungen v.a. die mittleren Laminae des cerebralen Cortex und das CA1-Band des Hippocampus betreffen (Smith et al. 1984b). Später konnte auch eine Schädigung des dorsolateralen Striatums nachgewiesen werden (Lin et al. 1998).

Der Hippocampus, insbesondere das CA1-Band, hat sich zur Beurteilung und Quantifizierung globaler ischämischer Schädigungen etabliert (Lin et al. 1998). Dies hängt in erster Linie mit der hohen Reproduzierbarkeit der neuronalen Schädigung und, bedingt durch die laminare Anordnung der Zellen, der guten visuellen Erfassung der Schädigung zusammen (Smith et al. 1984; Mennel et al. 1988; Corbett und Nurse 1998; Lin et al. 1998). Ferner zeigen sich schon bei relativ geringen

Ischämiezeiten ausgeprägte Schädigungen. Primär betroffen sind die großen Pyramidenzellen im CA1-Band (auch: *Stratum pyramidale*) des Hippocampus (Johansen 1993). Die dabei erzielte Verteilung der neuronalen Verluste im Hippocampus ist nicht kongruent. Sie schwankt zwischen kaudalem und rostralem Hippocampus. Dabei erreicht sie ihr Punctum maximum im Bereich des rostralen Hippocampus (Kirino und Sano 1984; Schmidt-Kastner und Freund 1991).

Die hier zu beobachtenden Zellschädigungen entstehen innerhalb von zwei bis vier Tagen (Kirino et al. 1984) und sind nach etwa sieben Tagen weitgehend abgeschlossen.

Es kann als weithin akzeptiert gelten, dass der Hirntemperatur während der Durchführung von Untersuchungen an Ischämie modellen eine einflußreiche und kritische Rolle zukommt. Schon eine geringe Hypothermie führt zu einer Verminderung der ischämischen Zellschädigung im Hippocampus (Busto et al 1987), während eine Erhöhung der Temperatur auf 39°C zu einer erheblichen Zunahme der Zellschädigung führt (Dietrich et al. 1990). Miyazawa und Hossmann zeigten, dass zur genauen Ermittlung der Körperkerntemperatur ein Einführen des Messfühlers um 5-6 cm erforderlich ist. Dies ist von Bedeutung, um falsch-hohe Temperaturwerte zu vermeiden, welche zu einer Zunahme der Zellschädigung führen würden (Miyazawa und Hossmann 1992). Außerdem trägt das genau definierte Vorgehen bei der Temperaturerfassung dazu bei, einen systematischen Fehler zwischen den Versuchsgruppen zu minimieren.

Hirntemperatur und Körperkerntemperatur korrelieren unter ischämischen Bedingungen nur unzureichend miteinander. Die Hirntemperatur fällt während der Ischämie um etwa 3-5°C (Minamisawa et al. 1990; Brambrink et al. 1999). Daher ist es notwendig, die Hirntemperatur während der Ischämie möglichst konstant zu halten. Dies geschah mittels einer Heizplatte zur Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur und einer Heizlampe zur Aufrechterhaltung der Hirntemperatur, welche über die eingebrachten Temperatursonden in einem Regelkreislauf eingebunden waren. Die Solltemperatur betrug in den hier vorgelegten Versuchen sowohl für die kraniale Temperatur, als auch für die Körperkerntemperatur 37°C. In beiden Versuchsarmen lagen die mittleren Schwankungen um die Solltemperatur innerhalb einer vorher definierten Toleranz von $\pm 0,5^\circ\text{C}$ mit der größten mittleren Abweichung von $+0,4^\circ\text{C}$ in der Baclofengruppe

des präischämischen Versuchsarmes zum Zeitpunkt TC2 (während der Ischämie). Der Unterschied zur Kontrollgruppe in der entsprechenden Messung betrug $0,2^{\circ}\text{C}$.

Die Hirntemperatur wurde über die Platzierung der kranialen Temperaturmesssonde unter der Kopfhaut nur näherungsweise erfasst.

Die im Musculus temporalis gemessene Temperatur und die oberflächliche Hirntemperatur zeigen bei mittleren globalen Ischämiezeiten jedoch nur geringe Abweichungen (Busto et al. 1987; Brambrink et al. 1999) und eigneten sich somit zum zuverlässigen Temperaturmonitoring während der Versuche.

Eine bedeutende Einflussgröße bezüglich der Höhe der ischämischen Schädigung stellt dabei nicht nur die intra- oder unmittelbar postischämisch abgeleitete Temperatur dar, sondern auch die Umgebungstemperatur nach Beendigung der Versuche. Untersuchungen an Ratten zeigten, dass die Zellschädigungen von Tieren, welche bei 20°C Raumtemperatur nachbeobachtet und wach wurden, erheblich geringer ausfielen gegenüber den Tieren die bei 30°C Raumtemperatur behandelt wurden (Seif el Nasr et al. 1992). Aus diesem Grund wurden die in dieser Untersuchung behandelten Tiere nach Beendigung der Versuche und Entfernung der Heizmatte bis zum Erwachen bei etwa 30°C Umgebungstemperatur unter eine Heizlampe verbracht.

Ähnlich der präzisen Überwachung und Kontrolle der Körperkern- und Hirntemperatur hat auch der Blutglukosespiegel einen großen Einfluss auf das Ausmaß der ischämischen Zellschädigung und somit große Bedeutung für die methodische Qualität bei *in vivo* Untersuchungen auf dem Gebiet der cerebralen Ischämie.

Das Vorliegen einer hyperglycämischen Stoffwechsellage während der cerebralen Ischämie führt zu einer deutlichen Steigerung der ischämischen Zellschädigung (Pulsinelli et al. 1982). Dabei spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. In erster Linie führt das relative Überangebot an Glukose während der Ischämie zu einer Zunahme des anaeroben Metabolismus mit einer konsekutiven Erhöhung von Laktat und H^+ -Ionen (Siesjö 1988). Neben der Azidose-vermittelten Schädigung werden noch eine Steigerung des osmotischen Gradienten mit Zunahme der Hirnödemeigung (Morimoto et al. 1996) sowie eine Laktat-vermittelte Exzitotoxizität (Xiang et al. 2004) als potentielle Faktoren diskutiert.

Um einen möglichst konstanten und basalen Glukosespiegel zu erzielen, wurde den in dieser Studie verwendeten Tieren am Vorabend des Experiments der Zugang zum Futter entzogen.

Die Messung des initialen Blutglukosespiegels zeigte in beiden Baclofenarmen gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erhöhte Werte. Im Mittel lagen diese etwa um 15 mg/dl in der präischämischen und 30 mg/dl in der postischämischen Versuchsgruppe über den in den Kontrollgruppen gemessenen Werten. Die am Ende der Versuche gemessenen Blutglukosespiegel erreichten dabei in den Verumgruppen gegenüber den Kontrollgruppen immer noch erhöhte Werte, sie glichen sich jedoch mehr an und erreichten dabei kein signifikantes Niveau mehr. Diese Unterschiede schränken die methodische Qualität der Studie grundsätzlich ein, da der Unterschied zwischen den Glukosespiegeln möglicherweise ein höheres Schädigungsniveau bei den mit Baclofen behandelten Tieren bedeutet. Allerdings leitet sich die Hypothese der erhöhten neuronalen ischämischen Schädigung unter hyperglykämischen Bedingungen von Versuchen ab, in denen die Unterschiede zwischen den gemessenen Glukosespiegeln erheblich waren (Morimoto et al. 1996). Die in beiden Versuchsarmen gemessenen Glukosespiegel bewegen sich im für Ratten normwertigen Bereich. Somit ist nicht von einer zusätzlichen Schädigung durch die relativ geringe Differenz der Serumglukosespiegel zwischen Kontroll- und Verumgruppen auszugehen.

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1 EFFEKTE DER INTRATHEKALEN BACLOFENAPPLIKATION AUF DIE ZELLSCHÄDIGUNG IM HIPPOCAMPUS

Baclofen, β -[4-Chlorophenyl]-GABA, hat als selektiver Agonist am GABA_B-Rezeptor einen festen Platz in der medikamentösen Therapie der Spastik. Dabei stehen grundsätzlich zwei Applikationsformen zur Verfügung. Zum einen die systemische Applikation – oral oder intravenös, zum anderen die intrathekale Applikation. Diese erfolgt beim Menschen über eine Lumbaldrainage, bzw. eine operativ eingebrachte Medikamentenpumpe mit justierbarer Dosierungsmöglichkeit.

Während die orale Gabe von Baclofen seit ca. drei Jahrzehnten fest etablierter Standard in der Therapie der spinalen und supraspinalen Spastik ist (Ochs und Reimann 1995), besteht die Möglichkeit der intrathekalen Baclofengabe erst seit ca.

zehn Jahren (Coffey et al. 1993). Dabei ist die Anwendung von Baclofen intrathekal aufgrund mangelnder Erfahrung der medikamentösen (Neben-)Wirkungen momentan noch nicht zur Behandlung in der Akutphase von Erkrankungen des zentralen Nervensystems zugelassen.

Neben der Spastiktherapie haben sich in den letzten Jahren zunehmend neue Indikationsfelder für die Baclofentherapie eröffnet. Baclofen zeigt Wirkung bei der Behandlung des therapieresistenten Singultus (Guelaud et al. 1995; Kumar und Dromerick 1998) sowie als supplementäre Substanz zur Verminderung der Entzugssymptomatik beim Kokainentzug (Ling et al. 1998).

Die hier vorgelegten Ergebnisse der Untersuchung von intrathekal appliziertem Baclofen unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen am Vier-Gefäß-Okklusionsmodell der Ratte zeigen keinen neuroprotektiven Effekt. Weder im Versuchsarm, in dem Baclofen 30 Minuten vor Okklusion gegeben wurde, noch im Versuchsarm, in dem Baclofen 30 Minuten nach Okklusion gegeben wurde, läßt sich ein signifikanter neuroprotektiver Effekt, dargestellt als Verminderung des prozentualen Anteils geschädigter Neurone im CA1-Band des Hippocampus, nachweisen. Im Gegenteil: Wird Baclofen vor Durchführung der globalen Hirnischämie gegeben, so zeigt sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Schädigung der Neurone. Dieses Ergebnis erreicht zwar aufgrund der hohen Spannweite der Resultate und der daraus resultierenden hohen Standardabweichung kein signifikantes Niveau, läßt jedoch einen deutlichen Trend erkennen.

Es liegen bereits vereinzelte Berichte über die Anwendung von *systemisch* appliziertem Baclofen in Versuchsmodellen der cerebralen Ischämie verschiedener Spezies vor. Die Datenlage zeigt dabei ein heterogenes Bild. Während Pettigrew in einer 1988 erschienen Arbeit an einem Vier-Gefäß-Okklusionsmodell herausfand, dass Baclofen zu einer erhöhten Glutamat-Gewebekonzentration führt, was den Rückschluß zuläßt, dass Baclofen zu einer Verminderung der Glutamat-Ausschüttung während einer cerebralen Ischämie beiträgt, konnte dieser positive Effekt einer Untersuchung der Zellschädigung in einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe, ähnlich wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, nicht standhalten (Rosenbaum et al. 1989). In erstgenannter Untersuchung zeigte

Baclofen den größten Einfluß auf die Glutamat-Gewebekonzentration im Bereich des medialen Hippocampus bei einer Konzentration von 10, bzw. 20 mg/kg KG nach i.p. Applikation. In einer weiteren Untersuchung an Gerbils konnte Baclofen in einer Dosierung von 25 mg/kg KG nach i.p. Verabreichung keinen neuroprotektiven Effekt aufweisen (Araki et al 1991). Die Ergebnisse einer 1995 publizierten Studie an Gerbils legen einen dosisabhängigen neuroprotektiven Effekt von Baclofen mit einem Wirkungsmaximum bei 50, bzw. 100 mg/kg KG nach i.p. Injektion nahe. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch Babcock und Kollegen in einer 2002 veröffentlichten Arbeit, in der neben dem neuroprotektiven Effekt von Baclofen nach Injektion von 50 mg/kg i.p. auch eine Erhöhung der Calcium/Calmodulin Protein-Kinase II-Aktivität festgestellt werden konnte. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung verschiedener Substrate. Nach cerebraler Ischämie kommt es zu einer kritischen Verminderung dieses Enzyms. Das vorgestellte Ergebnis legt somit nahe, dass Baclofen zu einer Erhöhung der Kinase-Aktivität führt.

Die Dosis des in der vorliegenden Studie intrathekal verabreichten Baclofens beträgt 1,5 µg in 5 µl pro Tier. Das entspricht einer Dosis von ca. 6 µg/kg KG und liegt somit im oberen Bereich der in der humanen Baclofentherapie verwendeten intrathekalen Dosierung (Ochs und Reimann 1995).

Die Dosisanpassung gestaltet sich schwierig, da zum einen ein erheblicher Dosierungsunterschied zwischen systemischer und intrathekalen Baclofengabe vorliegt, zum anderen die Extrapolation von der humanen zur tierexperimentellen Therapie nicht ohne weiteres übertragbar erscheint.

Obwohl im Gegensatz zu GABA mit einem Phenylring (**Abb. 1.1**) substituiert und somit lipophilisiert, besitzt Baclofen nur eine mäßige Blut-Hirnschranken-Permeabilität. Das Dosis-Wirkungsverhältnis systemischer gegenüber intrathekalen Gabe wird mit etwa 1:100 bis 1:1000 angegeben (Ochs und Reimann 1995).

Leitet man aus den Ergebnissen der bisher veröffentlichten o.g. Arbeiten eine Wirkungskurve ab, so scheint Baclofen einen putativen zytotoxischen Effekt am ehesten im Bereich hoher Dosierungen zu entfalten. Nach intrathekalen, bzw. intracerebroventrikulärer Injektion ist jedoch von einer veränderten Wirkstoffkinetik auszugehen. Das Medikament wurde in dieser Untersuchung während eines Zeitraums von 5 min als Bolusinjektion verabreicht. Dabei wurde schon kurz nach Beginn der Injektion ein blutdrucksenkender Effekt deutlich, was erwartungsgemäß

für ein rasches Anfluten und Verteilen des Medikaments im Liquorraum spricht. Vergleicht man die Plasma- und Liquoreliminationshalbwertszeiten von systemisch, bzw. intrathekal gegebenem Baclofen beim Menschen, so zeigen sich mit 6-7 h für die systemische Gabe und etwa 5 h für die intrathekale Gabe, ähnliche Halbwertszeiten (Sallerin-Caute et al. 1991; Ochs und Reimann 1995). Über die genaue Verteilungskinetik hinsichtlich der Anflutungszeit systemisch verabreichten Baclofens liegen allerdings keine Ergebnisse vor.

Wie bereits eingangs erwähnt, besitzt Baclofen als selektiver GABA_BR-Agonist eine auf der Basis der Exzitotoxizitätstheorie (Olney 1967; Rothman und Olney 1986) beruhende potentielle Wirksamkeit als Neuroprotektivum. Damit ist gemeint, dass eine Aktivierung inhibitorischer GABA_BR zu einer Verminderung der Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat führt (Fox et al. 1978; Olpe et al. 1981; Thompson 1994), und somit zu einer Hemmung der überschießenden erregenden Aktivität während cerebral-ischämischer Ereignisse führt.

Allerdings ist die Rezeptorphysiologie des GABA_B-Systems, und damit auch die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten von Baclofen, komplex. Neben der postsynaptischen Lokalisation der GABA_BR mit dem K⁺-Kanal-vermittelten sIPSP finden sich noch präsynaptische GABA_BR, welche G-Protein-vermittelt den Ca⁺⁺-Einstrom vermindern (Misgeld et al. 1995). Zu dieser Gruppe zählt auch der GABA_B-Autorezeptor, welcher die GABA-Ausschüttung zu hemmen vermag. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass intrathekal verabreichtes Baclofen in hoher Dosis zu einer initial vermehrten Aktivierung GABA-erger Autorezeptoren führt, in Folge derer es zu einer Verminderung inhibitorischer GABA-erger Aktivität in der Akutphase der cerebralen Ischämie kommt. Dieser Effekt ist bekannt und trägt unter physiologischen Bedingungen zur Regulation der LTP, einem für Lernen und Gedächtnisleistungen grundlegendem neurophysiologischem Phänomen, bei. Dabei ermöglicht die durch Aktivierung der GABA_B-Autorezeptoren hervorgerufene Dysinhibition unter bestimmten Umständen erst das Zustandekommen der NMDAR-vermittelten exzitatorischen Aktivität (Davies et al. 1991).

Betrachtet man die Effekte der Zellschädigungsuntersuchungen bei der intrathekalen Baclofengabe unter Berücksichtigung der während der Versuche erhobenen physiologischen Parameter, so fallen mehrere Koinzidenzen auf. Zum einen findet

sich in beiden Versuchsgruppen eine Baclofen-abhängige Blutdrucksenkung. Dieser Effekt des Baclofens ist bekannt (Ochs und Reimann 1995), wobei der exakte Mechanismus der durch Baclofen ausgelösten arteriellen Hypotonie noch Gegenstand weiterer Forschung ist. Am ehesten ist von einer peripheren Vasodilatation mittels zentral aktivierter GABA_BR auszugehen (Estate et al. 2004). Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, welche mittels Mikrodialyse im Ncl. paraventricularis hypothalami der Ratte das Transmitterverhalten nach intrathekaler Gabe von Baclofen untersuchten, stützen diese Vermutung (Becker 2001). Dabei fiel zunächst eine kurzzeitige Verminderung der Glutamat-Konzentration auf, welche von einer mittelfristigen Erhöhung des ebenfalls inhibitorischen Neurotransmitters Glycin gefolgt wurde.

Diese Medikamentenwirkung ist jedoch in beiden Versuchsgruppen nur von kurzer Dauer. Im präischämischen Versuchsarm ist bereits zu Beginn der Ischämie kein signifikanter Unterschied des MABD zwischen Verum- und Kontrollgruppe mehr zu verzeichnen. Auch erscheint das Vermögen der mit Baclofen behandelten Versuchstiere, auf die Gefäßokklusion mit einer sympathisch vermittelten Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks zu reagieren, nicht kompromittiert.

Eine weitere Beobachtung betrifft die Messgrößen pH-Wert und Kohlendioxidpartialdruck während der präischämischen Medikamentengabe. Dort ist eine signifikante medikamentenabhängige Zunahme des Kohlendioxidpartialdruckes (pCO₂), bzw. Abnahme des pH-Wertes bei stabilem Sauerstoffpartialdruck, im Sinne einer respiratorischen Azidose zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang sollte bedacht werden, dass bei der Gabe von Baclofen als Agonist am GABA-Rezeptor letztendlich auch jene substanzgruppenspezifischen Nebenwirkungen und Komplikationen (Atemdepression, sedierende Wirkung) zu verzeichnen sind, wie man sie von der Gabe anderer GABA-Rezeptoragonisten, z.B. den Benzodiazepinen, her kennt.

Bezüglich des Kohlendioxidpartialdruckes ist dieser Effekt signifikant gegenüber den Messungen der Kontrollgruppe post applicationem bis zum Versuchsende. Der pH-Wert ist ebenfalls unmittelbar nach Baclofengabe bis zum Versuchsende vermindert, wengleich dabei der vierte Versuchswert - direkt nach Beendigung der cerebralen Ischämie - erniedrigt ist, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufzuweisen. Es ist bekannt, dass eine Hyperkapnie in

Zusammenhang mit einer cerebralen Ischämie zu einer Zunahme der neuronalen Schädigung führt (Katsura et al. 1994). Dieser Effekt wurde lediglich im präischämischen Versuchsarm beobachtet.

Bei Ratten intrathekal verabreichtes Baclofen konnte in der hier vorgelegten Untersuchung, prä- oder postischämisch appliziert, keinen neuroprotektiven Effekt aufweisen. Die präischämische Baclofengabe zeigte im Gegenteil eine zwar nicht signifikante, jedoch deutlich erhöhte Zellschädigung. Dass es sich dabei um einen per se zytotoxischen Effekt des Medikamentes handelt, erscheint nicht wahrscheinlich, da eine solche Medikamentenwirkung im postischämischen Versuchsarm nicht nachgewiesen werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen negativer respiratorischer Situation und Baclofengabe lässt sich ebenfalls aus dem Vergleich der beiden Versuchsarme ziehen.

4.3 PERSPEKTIVEN

Zur genaueren Einschätzung der hier präsentierten Ergebnisse, v.a. im Hinblick auf die Anwendung von Baclofen in der Akutphase neurologischer/neurochirurgischer Erkrankungen, sind weitere Untersuchungen notwendig:

1. Zunächst sollte in einer Dosisanpassungsstudie versucht werden, einen Dosis-Wirkungseffekt hinsichtlich der Auswirkung von intrathekal appliziertem Baclofen auf die neuronale Schädigung, zu erzielen.

a) Dabei sollte eine Dosisescalationsuntersuchung während der postischämischen Baclofengabe erfolgen, um einen möglicherweise vorhandenen neuroprotektiven Effekt bei höherer Dosis zu demaskieren.

b) Ferner ist es notwendig, das präischämisch verabreichte Baclofen in einer niedrigeren Dosis zu testen, um einen neurotoxischen Effekt auszuschließen.

2. Um den negativen respiratorischen Effekt der intrathekalen Baclofengabe während der cerebralen Ischämie auszugleichen, sollte eine Untersuchungsreihe mit mechanisch ventilierten Tieren durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Cerebral-ischämische Erkrankungen nehmen eine wichtige Rolle bei der Versorgung neurologischer und neurochirurgischer Patienten ein. Sie sind darüberhinaus ein enormer gesundheitsökonomischer Faktor.

Während die Erkenntnisse über die Pathophysiologie dieser Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten rasch zugenommen haben, stagniert die Umsetzung pharmakologischer Therapieansätze aus verschiedenen Gründen. Dies macht die Notwendigkeit der Erprobung neuer, klinisch anwendbarer Substanzen in der Klasse der Neuroprotektiva deutlich.

Baclofen, ein selektiver Agonist am GABA_B-Rezeptor, stellt ein seit ca. drei Jahrzehnten probates Pharmakon bei der Behandlung der spastischen Muskeltonuserhöhung dar. Neben der oralen oder intravenösen Darreichungsform kommt der intrathekalen Gabe von Baclofen eine zunehmend größere Bedeutung bei der Behandlung von Patienten mit Spastiken zu. Ergänzend zu dieser Indikation kristallisierten sich während der letzten Jahre neue Anwendungsgebiete für diese Substanz heraus. Darunter auch die intrathekale Gabe von Baclofen bei Patienten mit schweren und schwersten Hirnverletzungen, während deren intensivmedizinischer Behandlung es zu nicht anders beeinflussbaren vegetativen Entgleisungen kam.

Die vorliegende Arbeit versucht, einen Beitrag zur Aufklärung der Wirksamkeit von Baclofen als Neuroprotektivum zu leisten. An einem eigens entwickelten Modell der reversiblen, transienten, globalen Hirnischämie der Ratte wurde der Einfluß von intrathekal appliziertem Baclofen in einer Dosis von 6 µg/kg KG 30 Minuten vor und nach Durchführung einer zehnmütigen cerebralen Ischämie untersucht.

Als Zielregion der Untersuchung diente das CA1-Areal des Hippocampus, in dem die Zellschädigung anhand der Anteile geschädigter vs. ungeschädigter Neurone bestimmt wurde. Verglichen wurden Baclofen-behandelte Tiere mit Kontrolltieren die dem gleichen Procedere unterzogen wurden, jedoch anstatt des Verums eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung verabreicht bekamen. Untersucht wurden zusätzlich noch die Parameter Blutglukoseserumspiegel, Körperkern- und Kraniatemperatur, mittlerer arterieller Blutdruck, arterieller Sauerstoff-, Kohlendioxidpartialdruck und pH-Wert.

In dem präischämischen Versuchsarm konnte keine neuroprotektive Wirkung für Baclofen festgestellt werden. Im Gegenteil, zeigte doch das Ausmaß der Zellschädigung einen zwar nicht signifikanten, jedoch deutlich erhöhten Anteil geschädigter Neurone. Diese Beobachtung konnte bei den postischämisch mit Baclofen behandelten Tieren nicht gemacht werden. Hier wurde eine geringfügig verminderte Zellschädigung beobachtet, ohne dass diese jedoch ein signifikantes Niveau erreicht hätte.

In beiden Versuchsarmen kam es nach Applikation von Baclofen zu einer kurzzeitigen Blutdrucksenkung, die jedoch insbesondere im Fall des präischämischen Versuchsarms keinen Einfluß auf das intraschämische Blutdruckniveau mehr hatte. Allerdings ließ sich bei den präischämisch behandelten Tieren eine deutliche Ventilationseinschränkung mit Ausbildung einer respiratorischen Azidose und Hyperkapnie nachweisen. Dabei sollte bedacht werden, dass Baclofen als Agonist am GABA-Rezeptor mit Atemdepression und Sedierung vergleichbare substanzgruppenspezifische Nebenwirkungen besitzt, die auch anderen GABA-Agonisten, z.B. den Benzodiazepinen, eigen sind.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lassen sich zunächst keine weiteren Rückschlüsse bezüglich der Fragestellung ziehen. Eine neurotoxische Wirkung von Baclofen kann genausowenig ausgeschlossen werden wie ein neuroprotektiver Einfluß nachgewiesen werden kann.

Zur weiteren Evaluation der Fragestellung müssen zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Diese sollten eine Dosis-Wirkungsstudie einschließen, ebenso wie die mechanische Ventilation der Tiere zum Ausschluß respiratorischer Einflüsse auf die neuronale Schädigung.

6. Literaturverzeichnis

1. Alger BE., LeBeau F. (2001). GABAB receptors. Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission. M. H. Heidelberg, Springer. **1**: 5ff.
2. Araki T., Kato H., Kogure K. (1991). "Comparative protective effects of vinconate, baclofen, and pentobarbital against neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil." Research in Experimental Medicine **191**: 371-378.
3. Auer RN., Jensen ML., Wishaw IQ. (1989). "Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus." Journal of Neuroscience **9**: 1641-47.
4. Babcock AM., Everingham A., Paden CM., Kimura M. (2002). "Baclofen Is Neuroprotective and Prevents Loss of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Immunoreactivity in the Ischemic Gerbil Hippocampus." Journal of Neuroscience Research **67**: 804–811.
5. Bayer, S. (1985). Hippocampal region. The rat nervous system. Paxinos, Academic Press Australia: 335-52.
6. Becker R., Alberti O., Bauer BL. (1997). "Continuous intrathecal baclofen infusion in severe spasticity after traumatic or hypoxic brain injury." Journal of Neurology **244**: 160–166.
7. Becker R., Benes L., Sure U., Hellwig D., Bertalanffy H. (2000). "Intrathecal baclofen alleviates autonomic dysfunction in severe brain injury." Journal of Clinical Neuroscience **7**(4): 316-319.

8. Becker R. (2001). "Klinische und experimentelle Beiträge zur intrathekalen Baclofenapplikation." Medizinische Habilitationsschrift, Klinik für Neurochirurgie. Marburg, Philipps-Universität: 124
9. Becker WJ., Harris CJ., Long ML., Ablett DP., Klein GM., DeForge DA. (1995). "Long-term intrathecal baclofen therapy in patients with intractable spasticity." Canadian Journal of Neurological Sciences **22**: 208–217.
10. Bettler B., Kaupmann K. (2001). Structure of GABAB receptors. Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission. M. H. Heidelberg, Springer. **1**: 299-309.
11. Billinton A, Ige AO., Wise A, White JH, Disney GH, Marshall FH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Emson PC (2000). "GABAB receptor heterodimer-component localisation in human brain." Molecular Brain Research **77**: 111–124.
12. Block, F. (1999). "Global ischemia and behavioural deficits." Progress in Neurobiology **58**: 279-295.
13. Bormann, J. (2000). "The 'ABC' of GABA receptors." TIPS **21**(1): 16-19.
14. Bowery, N. (2001). Pharmacology of GABAB receptors. Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission. M. H. Heidelberg, Springer. **1**: 311-27.
15. Bowery N.G., Hill D., Hudson AL., Doble A., Middlemiss DN., Shaw J., Turnbull M. (1980). "(-)Baclofen decreases neurotransmitter release in mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor." Nature **283**: 92-94.
16. Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J. (2002). "International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian Gamma-Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function." Pharmacological Reviews **54**: 247–264.

17. Brambrink AM., Kopacz L., Astheimer A., Noga H., Heimann A., Kempski O. (1999). "Control of brain temperature during experimental global ischemia in rats." Journal of Neuroscience Methods **92**: 111–122.
18. Buchan AM., Lesiuk H., Barnes KA., Li H., Huang ZG., Smith KE., Xue D. (1993). "AMPA antagonists - do they hold more promise for clinical stroke trials than NMDA antagonists?" Stroke **24**: 1148-52.
19. Busto R., Dietrich WD., Globus MYT., Valdes I., Scheinberg P., Ginsberg MD. (1987). "Small differences in intrischemic brain temperature critically determine the extend of ischemic neuronal injury." Journal of cerebral blood flow and metabolism **7**: 729-38.
20. Calver AR., Robbins MJ., Cosio C., Rice SQJ., Babbs AJ., Hirst WD., Boyfield I., Wood MD., Russell RB., Price GW., et al. (2001). "The C-terminal domains of the GABAB receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling." Neuroscience **21**: 1203–1210.
21. Castelli MP., Ingianni A., Stefanini E., Gessa GL. (1999). "Distribution of GABAB receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs." Life Sci **64**: 1321–1328.
22. Cherubini E., Conti F. (2001). "Generating diversity at GABAergic synapses." Trends in Neurosciences **24**(1): 155-162.
23. Chu DCM., Albin RL., Young AB., Penney JB. (1990). "Distribution and kinetics of GABAB binding sites in the rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study." Neuroscience **34**(2): 341-57.
24. Coffey RJ., Cahill D., Steers W. et al. (1993). "Intrathecal baclofen for intractable spasticity of spinal origin: results of a long-term multi-center study." Journal of Neurosurgery **78**: 226–32.

25. Corbett D., Nurse S. (1998). "The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia." Progress in Neurobiology **54**: 531-48.
26. Davies CH., Starkey SJ., Pozza MF., Collingridge GL (1991). "GABAB autoreceptors regulate the induction of LTP." Nature **349**: 609-611.
27. Dietrich WD., Busto R., Valdes I., Loores Y. (1990). "Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats." Stroke **21**: 1318-25.
28. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz MA. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." TINS **22**(9): 391-97.
29. Dirnagl U., Simon R., Hallenbeck JM. (2003). "Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection." TRENDS in Neurosciences **26**(5 (May)): 248-54.
30. Dutar P., Nicoll R. (1988). "Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties." Neuron **1**: 585-91.
31. Estado V., Araújo CV., Bousquet P., Tibiricá E. (2004). "Effects of centrally acting antihypertensive drugs on the microcirculation of spontaneously hypertensive rats." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **37**: 1541-49.
32. Fox S., Krnjevic K., Morris ME., Pull E., Werman R. (1978). "Action of Baclofen on mammalian synaptic transmission." Neuroscience **3**: 495-515.
33. Francis J., Zhang Y., Ho W., Wallace MC. , Zhang L. , Eubanks JH. (1999). "Decreased Hippocampal Expression, but Not Functionality, of GABAB Receptors After Transient Cerebral Ischemia in Rats." J. Neurochem. **72**: 87-94.

34. Ginsberg MD., Busto R. (1989). "Rodent models of cerebral ischemia." Stroke **20**: 1627-1642.
35. Gionet T., Thomas JD., Warner DS., Goodlett CR., Wassermann EA., West JR. (1991). "Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats." Stroke **22**: 1040-47.
36. Green EJ., Pazos AJ., Dietrich WD., McGabe PM., Schneidermann N., Lin B., Busto R., Globus MYT., Ginsberg MD. (1995). "Combined postischemic hypothermia and delayed MK-801 treatment attenuates neurobehavioral deficits associated with transient global ischemia in rats." Brain Research **702**: 145-152.
37. Guelaud C., Similowski T., Bizec JL., Cabane J., Whitelaw WA., Derenne JP. (1995). "Baclofen therapy for chronic hiccup." European Respiratory Journal **8**: 235-37.
38. Harris RJ., Symon L., Branston NM., Bayhan M. (1981). "Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia." Journal of cerebral blood flow and metabolism **1**: 203-09.
39. Hartley D., Kurth MJ., Bjerkness L., Weiss JH., Choi DW. (1993). "Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration." Journal of Neuroscience **13**(5): 1993-2000.
40. Hebel (1976). Anatomy of the laboratory rat, W&W.
41. Hill DR., Bowery NG. (1981). " ^3H -baclofen and ^3H -GABA bind to bicuculline-insensitive GABAB sites in rat brain." Nature **290**: 149-52.
42. Johansen, F. (1993). "Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia." Acta Neurologica Scandinavica **88** [Supplementum 150]: 1-31.

43. Jones KA., Borowsky B., Tamm JA., Craig DA., Durkin MM., Dai M., Yao WJ., Johnson M., Gunwaldsen C., Huang LY., et al. (1998). "GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2." Nature **396**: 674–79.
44. Karlsson G., Olpe H. (1989). "Late inhibitory postsynaptic potentials in rat prefrontal cortex may be mediated by GABAB receptors." Experientia **45**: 157-158.
45. Katsura K., Kristian T., Smith ML., Siesjö B.K. (1994). "Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **14**: 243–250.
46. Katsura K., Kristian T., Siesjö B.K. (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." Biochem. Soc. Trans. **22**: 991-96.
47. Kirino T., Tamura A., Sano K. (1984). "Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia." Acta Neuropathologica **64**: 139-147.
48. Kirino T., Sano K. (1984). "Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia." Acta Neuropathologica **62**: 201-08.
49. Korenkov AI., Niendorf WR., Darwish N., Glaeser E., Gaab MR. (2002). "Continuous intrathecal infusion of baclofen in patients with spasticity caused by spinal cord injuries." Neurosurgical Reviews **25**: 228–230.
50. Kriegstein J., Seif el Nasr M., Lippert K. (1997). "Neuroprotection by Memantine as increased by hypothermia and Nimodipine." European Journal of Pharmaceutical Sciences **5**: 71-77.
51. Kumar A., Dromerick AW. (1998). "Intractable hiccups during stroke rehabilitation." Archives of Physical Medicine and Rehabilitation **79**: 697-99.

52. Lal S., Shuaib A., Ijaz S. (1995). "Baclofen is Cytoprotective to Cerebral Ischemia in Gerbils." Neurochemical Research **20**(2): 115-19.
53. Levine S., Payan H. (1966). "Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*)." Experimental Neurology **16**: 255–262.
54. Li H., Buchan AM. (1993). "Treatment with an AMPA antagonist 12 h following severe normothermic forebrain ischemia prevents CA1 neuronal injury." Journal of cerebral blood flow and metabolism **13**: 933-39.
55. Lin B., Ginsberg MD., Busto R., Dietrich WD. (1998). "Sequential analysis of subacute and chronic neuronal, astrocytic and microglial alterations after transient global ischemia in rats." Acta Neuropathologica **95**: 511-23.
56. Ling W., Shoptaw S., Majewska D. (1998). "Baclofen as a cocaine anti-craving medication: a preliminary clinical study." Neuropsychopharmacology **18**: 403-4.
57. Lyden, P. (1997). "GABA and Neuroprotection." International Review of Neurobiology **40**: 233-258.
58. Lyden PD., Lonzo L. (1994). "Combination Therapy Protects Ischemic Brain in Rats - A Glutamate Antagonist Plus a g-Aminobutyric Acid Agonist." Stroke **25**: 189-96.
59. Margeta-Mitrovic M., Jan YN., Jan LY. (2000). "A trafficking checkpoint controls GABAB receptor heterodimerization." Neuron **27**: 97–106.
60. Mennel HD., Sauer D., Rossberg C., Bielenberg GW., Krieglstein J. (1988). "Morphology of tissue damage due to experimental cerebral ischemia in rats." Experimental Pathology **35**: 219-230.

61. Minamisawa H., Nordstrom CH., Smith ML. (1990). "Preservation of brain temperature during ischemia in rats." Stroke **21**: 758-64.
62. Misgeld U., Bijak M., Jarolimek W. (1995). "A physiological role for GABAB receptors and the effects of Baclofen in the mammalian nervous system." Progress in Neurobiology **46**: 423-462.
63. Miyazawa T., Hossmann KA. (1992). "Methodological requirements for accurate measurements of brain and body temperature during global forebrain ischemia of rat." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **12**: 817-22.
64. Morimoto Y., Morimoto Y., Warner DS., Pearlstein RD. (1996). "Acute changes in Intracranial Pressure and Pressure-Volume Index After Forebrain Ischemia in Normoglycemic and Hyperglycemic Rats." Stroke **27**: 1405-10.
65. Nedergaard, M. (1987). "Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction." Brain Research **408**: 79–85.
66. Nellgard B., Wieloch T. (1992). "Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in rat brain following transient severe cerebral ischemia." Journal of cerebral blood flow and metabolism **12**: 2-11.
67. Nelson A., Lebessi A., Sowinski P., Hodges H. (1997). "Comparison of effects of global ischemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance." Behavioral Brain Research **85**: 93-116.
68. Newberry NR., Nicoll RA. (1985). "Comparison of Baclofen with GABA on rat hippocampal pyramidal cells in vitro." Journal of Physiology **360**: 161-185.

69. Nunn JA., LePeillet E., Netto CA., Hodges H., Gray JA., Meldrum BS. (1994). "Global ischemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze." Behavioral Brain Research **62**: 41-54.
70. Obrenovitch TP., Urenjak J. (1997). "Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy." Progress in Neurobiology **51**: 39-87.
71. Ochs GA., Reimann IW. (1995). Baclofen Intrathekal - Leitfaden für die praktische Anwendung. Stuttgart; New York, Georg Thieme Verlag.
72. Olney, J. (1969). "Brain-lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." Science **164**: 719-21.
73. Olpe HR., Demieville H., Baltzer V., Bencze WL., Koella WP., Wolf P., Haas HL. (1978). "The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal)." European Journal of Pharmacology **52**: 133-36.
74. Olpe HR., Baudry M., Fagni L., Lynch G. (1981). "The blocking action of baclofen on excitatory transmission in the rat hippocampal slice." Journal of Neuroscience **2**(6): 698-703.
75. Orsnes G., Crone C., Krarup C., Petersen N., Nielsen J. (2000). "The effect of baclofen on the transmission in spinal pathways in spastic multiple sclerosis patients." Clinical Neurophysiology **111**: 1372–1379.
76. Paxinos G., Watson C. (1986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Sydney, Academic Press.
77. Penn RD., Savoy SM., Corcos D., Latash M., Gottlieb G., Parke B., Kroin JS. (1989). "Intrathecal baclofen for severe spinal spasticity." New England Journal of Medicine **320**: 1517–1521.

78. Pettigrew LC., Rosenbaum DM., Grotta JC. (1988). The effect of baclofen on regional levels of glutamate in normal and ischemic rat brain. Pharmacology of Cerebral Ischemia 1988, Marburg/Lahn.
79. Pulsinelli WA., Brierley JB. (1979). "A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat." Stroke **10**(3): 267-272.
80. Pulsinelli WA., Levy DE., Duffy TE. (1982). "Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia." Annals of Neurology **11**: 499-509.
81. Pulsinelli WA., Waldman S., Rawlinson D., Plum F. (1982). "Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat." Neurology **32**: 1239–1246.
82. Pulsinelli WA., Buchan AM. (1988). "The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of the vertebral arteries and control of collateral circulation." Stroke **19**: 913-14.
83. Rosenbaum D., Grotta JC., Pettigrew C., Ostrow P., Strong R., Rhoades H., Picone C., Grotta A. (1989). "Baclofen does not protect against cerebral ischemia in rats." Stroke **21**: 138-140.
84. Rothman SM., Olney JW. (1986). "Glutamate and pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage." Annals of Neurology **19**: 105-111.
85. Sallerin-Caute B., Lazorthes Y., Monsarrat B., Cros J., Bastide R. (1991). "CSF baclofen levels after intrathecal administration in severe spasticity." European Journal of Clinical Pharmacology **40**: 363-65.

86. Sampson FC., Hayward A., Gillian E., Morton R., Collett B. (2002). "Functional benefits and cost/benefit analysis of continuous intrathecal baclofen infusion for the management of severe spasticity." Journal of Neurosurgery **96**: 1052–1057.
87. Schaper C., Zhu J., Kouklei M., Culmsee C., Krieglstein J. (2000). "Stimulation of 5HT1A receptors reduces apoptosis after transient forebrain ischemia in the rat." Brain Research **883**: 41-50.
88. Schmidt-Kastner R., Freund TF. (1991). "Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia." Neuroscience **40**: 599-636.
89. Seif el Nasr M., Nuglisch J., Krieglstein J. (1992). "Prevention of Ischemia-Induced Cerebral Hypothermia by Controlling the Environmental Temperature." Journal of Pharmacological Methods **27**: 23-26.
90. Siesjö, B. (1988). "Acidosis and Ischemic Brain Damage." Neurochem Pathol **9**: 31-88.
91. Siesjö, B. (1992). "Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I: Pathophysiology." Journal of Neurosurgery **77**: 169-184.
92. Smith ML., Bendek G., Dahlgren N., Rosén I., Wieloch T., Siesjö BK. (1984). "Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2.A 2-vessel occlusion model." Acta Neurologica Scandinavia **69**: 385-401.
93. Smith ML., Auer RN., Siesjö BK. (1984). "The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia." Acta Neuropathologica **64**: 319-332.
94. Thompson, S. (1994). "Modulation of inhibitory synaptic transmission in the hippocampus." Progress in Neurobiology **42**: 575–609.

95. Voll CL., Wishaw IQ., Auer RN. (1989). "Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats." Stroke **20**: 646-51.
96. Xiang Z., Yuan MY., Hassen GW., Gampel M., Bergold PJ. (2004). "Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures." Experimental Neurology **186**: 70-77.

7. Anhang

7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

4VOM	<i>4-vessel-occlusion-model</i> (Vier-Gefäß-Okklusionsmodell)
2VOM	<i>2-vessel-occlusion-model</i> (Zwei-Gefäß-Okklusionsmodell)
5HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5HT _{1A} R	Serotonin-Rezeptor vom Typ 1A
AMPA	Glutamat-Rezeptor vom α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole-Propionacid-Typ
CBF	cerebraler Blutfluß
CCAO	<i>common carotid artery occlusion</i> (Verschluß der A. carotis communis)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EAS	Exzitatorische Aminosäuren
fIPSP	<i>fast inhibitory postsynaptic potential</i> (schnelles inhibitorisches post-synaptisches Potential)
GABA	γ -amino-butyric-acid (γ -Amino-Buttersäure)
GABA _A R	GABA-Rezeptor vom Typ A
GABA _B R	GABA-Rezeptor vom Typ B
GAD	<i>glutamate acid decarboxylase</i> (Glutaminsäure-Decarboxylase)
Glu	Serumglukosespiegel
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathekal
KA	Kainsäure

KKT	Körperkerntemperatur
KG	Körpergewicht
LTP	<i>Long-term potentiation</i> Langzeitpotentierung
MABD	mittlerer arterieller Blutdruck
MABP	<i>mean arterial blood pressure</i>
NMDAR	Glutamat-Rezeptor vom <u>n</u> - <u>methyl-d</u> - <u>A</u> spartat-Typ
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> -Puffer
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PE	Polyäthylen
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
S.D.	Standardabweichung
sIPSP	<i>slow inhibitory postsynaptic potential</i> (langsames inhibitorisches post-synaptisches Potential)
T	Temperatur
TC	craniale Temperatur
UE	Untereinheit
VAO	<i>vertebral artery occlusion</i> (Verschluß der A. vertebralis)
VSCC	<i>voltage sensitive calcium channel</i> (spannungsabhängiger Calciumkanal)

7.3 Danksagung

Für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit möchte ich herzlich danken:

Herrn PD Dr. Ralf BECKER für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung, die anregende Kritik und seine Geduld in fachlichen Diskussionen. Darüberhinaus vermittelte mir Dr. Becker erste Einblicke in mikrochirurgische Operationstechniken, welche meinen beruflichen Werdegang bisher in nicht unerheblichem Maße beeinflusst haben.

Herrn Prof. Dr. Helmut BERTALANFFY für die Förderung bei der Durchführung der vorliegenden Dissertation und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Josef KRIEGLSTEIN und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. Carsten CULMSEE aus dem Institut für Pharmakologie der Philipps-Universität Marburg für die Stellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie, die nette Aufnahme im Institut sowie deren unschätzbare praktische und theoretische Unterstützung im Zusammenhang mit der Durchführung des Ischämie Modells.

Herrn Professor Dr. Hans-Dieter MENNEL aus der Abteilung für Neuropathologie für die geduldigen Diskussionen und Hilfestellungen bei Fragen im Zusammenhang mit der Erstellung der histologischen Präparate.

Den MTAs Sandra ENGEL aus dem Institut für Pharmakologie der Philipps-Universität Marburg sowie Daniela FORGE, Sabine JENNEMANN, Sabine MOTZNY, Regina STÖHR und Beate BUTTLER aus der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg für deren unschätzbare Organisationsarbeit und die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Jochen ROHLFS aus der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg für die fachlichen Diskussionen.

Herrn Florian STUBENVOLL für die unzähligen Diskussionen und die mehr als freundliche Zusammenarbeit.