

Aus der ZNS-Forschung
der Schering AG Berlin, eingereicht über das
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Freien Universität Berlin

**Der Einfluß der Okklusionsdauer und der Einfluß von
Ebselen auf Infarktgröße, Ödemfaktor und
Neurologischen Status bei einem Modell der permanenten
und temporären Zerebralischämie bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörn Gethmann
Tierarzt aus Berlin
Berlin 1999

Journal- Nr. 2372

Abkürzungen**Bedeutung**

ACA	A. cerebialis anterior (Anterior Cerebral Artery)
AMPA	2-Aminomethylphenylazetat
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke (Blood Brain Barrier)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CBF	Cerebral Blood Flow (zerebraler Blutfluß)
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit (Cerebro-Spinal Fluid)
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
FDA	Federal Drug Administration
ICAM	intrazelluläres Adhesionsmolekül (Intracellular Adhesion Molecule)
IP ₃	Inositol-tris-Phosphat
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MCA	mittlere Zerebralarterie (Middle Cerebral Artery)
MCAO	Okklusion der mittleren Zerebralarterie (Middle Cerebral Artery Occlusion)
MK-801	Dizocilpine
NADPH	Nikotinamid-Adenin Dinukleotidphosphat
NBQX	2,3-dihydro-6-nitro-7sulphamoylbenzo(F)quinoxalin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitric oxide
PKc	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
SHR	spontan hypertensive Ratten (Spontaneous Hypertensive Rats)
SOD	Superoxid Dismutase
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

**Statistische
Abkürzungen**

Bedeutung

H	Prüfgröße des Kruskal-Wallis-Tests
n, m	Gruppengrößen der zu vergleichenden Gruppen beim Mann-Whitney-Tests
P	Wahrscheinlichkeit
Q	Quartilsabstand
r_s	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SE	Standardfehler (Standard Error)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
U	Prüfgröße des Mann-Whitney-Tests

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Folgen der zerebralen Ischämie	2
1.1.1 Mögliche therapeutische Maßnahmen	8
1.2 Ziel der Arbeit	9
1.3 Zur Methodik	10
1.3.1 Wahl des Versuchsmodells	10
1.3.2 Pharmakologie von Ebselen	11
2. Methoden	13
2.1 Versuchsplan	13
2.1.1 Ein- und Ausschlußkriterien	13
2.1.2 Versuchsreihen	14
2.1.3 Zuordnung zu den Versuchsgruppen	17
2.2 Material	17
2.2.1 Tiere und Tierhaltung	17
2.3 Versuchsdurchführung	18
2.3.1 Anfertigung des Fadens zur Okklusion der A. cerebri media	18
2.3.2 Durchführung der Operation	20
2.3.3 Auswertung des Neurologischen Status	22
2.3.4 Entnahme des Gehirns	24
2.3.5 Infarktauswertung	24
2.3.5.1 Schneiden der Gehirne	24
2.3.5.2 Auswertung des Hirninfarktolumens	25
2.4 Zur Auswertung	27
2.4.1 Ausgewertete Versuche	27
2.4.2 Statistische Methoden	28
3. Ergebnisse	30
3.1 Begriffserklärung	30
3.2 Versuchsreihe I - Unterschiedliche Okklusionszeiten	30
3.2.1 Tiere ohne Infarkt	31
3.2.2 Einfluß der Okklusionsdauer auf die Mortalität	33
3.2.3 Einfluß der Okklusionsdauer auf den Neurologischen Status	33
3.2.4 Einfluß der Okklusionsdauer auf die Infarktgröße	35
3.2.5 Einfluß der Okklusionsdauer auf den Ödemfaktor	35
3.2.6 Zusammenhang zwischen Infarktgröße und Neurologischem Status	36
3.2.7 Zusammenhang zwischen Infarktgröße und Ödemfaktor	36

3.3 Versuchsreihe II - Vergleich unterschiedlicher Dosierungen von Ebselen	38
3.3.1 Ebselengabe i.p. bei Wistar-Ratten	38
3.3.1.1 Tiere ohne Infarkt	39
3.3.1.2 Einfluß von Ebselen auf die Infarktgröße	41
3.3.2 Ebselengabe i.p. bei Long-Evans-Ratten	43
3.3.2.1 Tiere ohne Infarkt	45
3.3.2.2 Einfluß von Ebselen auf die Infarktgröße	45
3.3.3 Ebselengabe p.o. bei Wistar-Ratten	46
3.3.3.1 Tiere ohne Infarkt	48
3.3.3.2 Einfluß von Ebselen auf die Infarktgröße	48
3.3.4 Vergleich der Infarktgrößen von Versuchsreihe I und II	50
3.3.5 Vergleich der Infarktgrößen von Wistar- und Long-Evans-Ratten	50
3.3.6 Untersuchung auf Zusammenhang zwischen Neurologischem Status und Infarktgröße der Tiere aus Versuchsreihe II	52
3.3.7 Untersuchung auf Zusammenhang zwischen Ödemfaktor und Infarktgröße der Tiere aus Versuchsreihe II	52
4. Diskussion	55
4.1 Zu den Versuchen	55
4.1.1 Tierversuchsmodell	55
4.1.2 Tierauswahl	58
4.1.3 Zu den Versuchsreihen	59
4.1.3.1 Einfluß der Okklusionsdauer auf die Mortalität	60
4.1.3.2 Einfluß der Okklusionsdauer auf den Neurologischen Status	61
4.1.3.3 Einfluß der Okklusionsdauer auf das Hirnödem	61
4.1.3.4 Einfluß der Okklusionsdauer auf die Infarktgröße	62
4.1.3.5 Zusammenhang zwischen Ödemfaktor und Infarktgröße	64
4.1.3.6 Einfluß von Ebselen auf die Infarktgröße	64
4.2 Abschließende Bemerkungen	68
4.2.1 Permanente Okklusion der MCA	68
4.2.2 Temporäre Okklusion der MCA	68
4.2.3 Neurologische Untersuchung	69
4.2.4 Rattenstamm	69
Zusammenfassung	70
Summary	73
Literaturverzeichnis	75

Anhang	95
Anhang Ia: Chemikalien, Arzneimittel und Hilfsmittel	95
Anhang Ib: Geräte	96
Anhang Ic: Ernährung der Ratten	97
Anhang II – Tabellen zu den Versuchsreihen (Einzeldata)	98
Versuchsreihe I – Zeitverlauf	98
Versuchsreihe II - Vergleich unterschiedlicher Dosierungen von Ebselen	103
A) Ebselengabe i.p. bei Wistar-Ratten	103
B) Ebselengabe i.p. bei Long-Evans-Ratten	109
C) Ebselengabe oral bei Wistar-Ratten	112
Danksagung	117
Lebenslauf	119

Zusammenfassung

Der Einfluß der Okklusionsdauer und der Einfluß von Ebselen auf Infarktgröße, Ödemfaktor und Neurologischen Status bei einem Modell der permanenten und temporären Zerebralischämie bei der Ratte

Der ischämische Schlaganfall, verursacht durch einen die Zerebralarterie verschließenden Thrombus oder Embolus ist eine der Hauptursachen für Behinderung und Tod in den Industriestaaten. In den letzten Jahren wurden Versuche durchgeführt, den durch den Schlaganfall verursachten Ischämieschaden durch Lyse des verursachenden Thrombus zu verringern. Die Reperfusion des ehemals ischämischen Hirngewebes hat aber auch negative Konsequenzen, wie z.B. die Bildung freier Radikale und eine verstärkte Ödementwicklung.

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele:

- 1) Bei einem Modell der Zerebralischämie mit anschließender Reperfusion bei der Ratte wird der Zusammenhang zwischen der Zeit von Okklusionsbeginn bis zur Reperfusion und dem Infarktvolumens untersucht. Die Ischämie wird durch einen intravasal vorgeschobenen Faden verursacht, der den Ursprung der mittleren Zerebralarterie verschließt.
- 2) Dieses Modell zu benutzen, um den Einfluß des Antioxidants Ebselen auf die Infarktgröße bei permanenter Ischämie und Ischämie-Reperfusion zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Reperfusion der mittleren Zerebralarterie in diesem Modell bei Wistar-Ratten bis zu einer Okklusionsdauer von 2 Stunden - verglichen mit permanenter Ischämie - zu einer Reduktion des Infarktvolumens führt.

Eine Reperfusion zu einem späteren Zeitpunkt (3 oder 4 Stunden) verursacht ähnlich große Infarkte wie sie auch in der Versuchsgruppe mit permanenter Okklusion der mittleren Zerebralarterie beobachtet wurden, mit einer Tendenz zu erhöhter Mortalität. In diesem Teil der Arbeit konnten bei den technisch einwandfrei verlaufenen Operationen in einem hohen Prozentsatz Infarkte erzeugt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Ebselen auf das Infarktvolumen nach permanentem und 2stündigem Verschuß der mittleren Zerebralarterie bei Ratten untersucht. Bei den Tieren mit permanenter Ischämie konnte kein Einfluß von Ebselen auf die Infarktgröße festgestellt werden.

Bei den Ratten mit 2stündiger Ischämie, gefolgt von der Reperfusion des betroffenen Blutgefäßes, konnte trotz technisch erfolgreich verlaufener Operation (der Faden wurde die erwünschte Entfernung vorgeschoben, bis Widerstand fühlbar war und es wurde kein Gefäß perforiert) bei einer größeren Anzahl von Tieren (sowohl in den Substanz- als auch den Kontrollgruppen) kein Infarkt nachgewiesen werden. Außerdem gab es erhebliche Schwankungen in den Infarktgrößen bei den Tieren, bei denen sich ein Infarkt entwickelte. Da das Fehlen der Infarktbildung nicht an die Substanzgruppe gebunden war, wurden diese Tiere aus der statistischen Analyse (des Effektes von Ebselen auf das Infarktvolumen) ausgeschlossen. Dies führte in einigen Fällen zu kleinen Gruppengrößen (n=5). Die statistische Analyse, basierend auf den Tieren mit nachweisbarem Infarkt, konnte keinen therapeutischen Effekt von Ebselen auf das Infarktvolumen nachweisen (wie oben erwähnt, war die Gruppengröße in einigen Fällen sehr klein und die Variabilität des Infarktvolumens sehr hoch). Bei den Experimenten mit Long-Evans-Ratten konnte in einem ähnlich hohem Prozentsatz wie bei den Wistar-Ratten aus dem zweiten Teil der Arbeit kein Infarkt erzeugt werden. Im Vergleich mit den Wistar-Ratten aus dem ersten Teil der Arbeit war die Infarktgröße bei diesen Ratten sehr klein; es gab allerdings eine geringere Schwankungen als bei den Wistar-Ratten aus dem zweiten Teil der Studie.

Die Ursache der großen Unterschiede im Infarktvolumen zwischen ersten und zweiten Teil der Arbeit, besonders bei den Tieren mit 2stündiger Ischämie und anschließender Reperfusion, bleibt offen. Bei den Tieren mit Reperfusion war es nicht möglich, die exakte Position des Fadens am Ende des Versuches zu kontrollieren. Es ist möglich, daß die beobachteten Ergebnisse durch Unterschiede in der Gefäßstruktur oder im Gefäßdurchmesser zustande kamen, obwohl es keine bemerkenswerten Unterschiede im Körpergewicht der Tiere gab. Als denkbare Ursache muß auch Cremophor, dem Lösungsvermittler von Ebselen, das alle Tiere im zweiten Teil der Arbeit erhalten haben diskutiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die permanente Okklusion der mittleren Zerebralarterie durch einen intravaskular geschobenen Faden eine praktikable und chirurgisch weniger belastende Alternative zu dem Kraniektomiemodell ist. Das Modell mit temporärer Okklusion der mittleren Zerebralarterie ist problematisch und es müßte weiter modifiziert werden (z.B. durch Veränderung der Präparation des Okklusionsfadens oder durch Messung des zerebralen Blutflusses um den Grad des Verschlusses zu überprüfen) bevor es für pharmakologische Studien über den Einfluß auf die Infarktgröße verwendet werden kann.

Summary

The influence of occlusion time and the influence of ebselen on infarct volume, edema and neurologic score in a model of permanent or transient cerebral ischemia in the rat

Ischaemic stroke, caused by an occluding thrombus or thromboembolus in a cerebral artery, is a major cause of death and disability in the developed world. In recent years, attempts have been made to reduce the extent of ischaemic damage in stroke by lysis of the occluding thrombus. Reperfusion of previously ischaemic brain tissue may, however, also be associated with negative consequences, e.g. free radical production, increased oedema development. The aim of the studies described here was twofold:

- 1) To investigate the relationship between time of reperfusion and infarct volume in a model of cerebral ischaemia and reperfusion in the rat, in which ischaemia is induced by advancing an intravascular suture to occlude the origin of the middle cerebral artery (MCA).
- 2) Using this model, to investigate the effects of the antioxidant ebselen on infarct volume under conditions of permanent ischaemia or ischaemia-reperfusion.

The data obtained show that, in this model in Wistar rats, reperfusion of the middle cerebral artery at times up to and including 2 h after occlusion resulted in a reduction in infarct volume compared to permanent ischaemia. Reperfusion at later time points (3 or 4 h) gave rise to infarct volumes similar to those seen in the permanent ischaemia group with a tendency to increased mortality. In this part of the study, infarcts were consistently seen in animals in which the procedure was judged to have been technically successful.

In the second part of the study, the effects of ebselen were investigated in rats with permanent ischaemia or with reperfusion 2 h after occlusion. In animals with permanent occlusion, ebselen had no beneficial effect on infarct size. In the animals

with 2 h ischaemia followed by reperfusion, a larger number of animals (in both the treated and control groups) failed to develop measurable infarcts than was seen in the first part of the study, despite the procedure having been judged to be technically successful (i.e. the suture was advanced an appropriate distance until meeting resistance, no perforation of the vessel) and there was considerable variability in infarct size in animals which did develop infarcts. As failure to develop an infarct did not seem to be related to treatment group, these animals were excluded from the analysis of the effects of ebselen on infarct size, resulting in small group size ($n = 5$) in some cases. Statistical analysis based on those animals with demonstrable infarcts did not show a beneficial effect of ebselen on infarct size (although as stated above, in some cases, group size was small, with a large variability in infarct size). Experiments with a second strain of rats (Long-Evans) did not result in more reproducible infarcts. Infarct size in these animals was small compared to that seen in Wistar rats in the first part of the study, although the variability was somewhat less than with the Wistar rats in the second part of the study.

The question as to why there were such marked differences in infarct size between the first and second parts of the study, particularly with reperfusion after 2 h of ischaemia, remains open. In animals with reperfusion, it was not possible at the end of the experiment to determine the exact position of the suture during ischaemia. It is possible that differences in vascular anatomy or vessel diameter may have contributed to the differences seen, although there were no marked differences between the groups with regard to the weight of the animals. Another possible contributing factor may have been the vehicle for ebselen (cremophor), which all animals in the second part of the study received.

The data from this study show that permanent occlusion of the MCA by means of an intravascular suture is a practicable and surgically less invasive alternative to the craniectomy model. The model of occlusion with subsequent reperfusion is more problematic, and would require further modification (e.g. by altering the preparation of the occlusion suture or by measuring cerebral blood flow to assess the degree of ischaemia) before it can be recommended as a method for assessing the effects of pharmacological interventions on infarct size.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Fiona McDonald für die Betreuung in der ZNS-Forschung der Schering AG und ihre ständige Bereitschaft zu fachlicher Unterstützung und Beratung.

Herzlich danke ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. Rudolph Scherkl für die Übernahme dieser Arbeit und für seine freundlichen Anregungen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Hartmut Weiß für seine vielen Hinweise und Ratschläge in biometrischen Fragen.

Den Mitarbeitern der ZNS-Forschung der Schering AG, insbesondere Frau Petra Woy und Herrn Frank Fiske danke ich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.

Nicht vergessen möchte ich meinen Vater, Herrn Dr. J. W. Gethmann, der mich in humanpathologischen Fragen des Hirntraumas beraten hat.

Lebenslauf

Jörn Martin Gethmann

- 29.12.1970: geboren in Berlin-Charlottenburg
- 1977-1983: Besuch der Wald-Grundschule in Berlin-Charlottenburg
- 1983-1990: Besuch des Gymnasiums „Katholische Schule Liebfrauen“ in Berlin-Charlottenburg
- 12.06.1990: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
- WS1990-SS1996: Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin mit Abschluß im September1996
- Okt. 1996: Approbation als Tierarzt
- seit Okt. 1996: Doktorarbeit bei der Schering AG im Rahmen eines Stipendiums

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den in der Arbeit angegebenen Hilfsmitteln durchgeführt habe. Die Arbeit ist in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Jörn Gethmann