Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Herz -, Thorax - und Gefäßchirurgie

Leiter: Prof. Dr. med. Liebold

Etablierung eines Tiermodells zur perioperativen pharmakologischen Konditionierung von Ischämie - und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach Crossclamping der infrarenalen Aorta beim Kaninchen.

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Philipp Erhart

aus Ulm

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hubert Schelzig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus-Martin Muth

Tag der Promotion: 26.06.2014

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Ätiologie und Therapie des Aortenaneurysmas 1

1.2 Pathophysiologie der ischämischen Rückenmarksschädigung 3

1.3 Prophylaxe durch pharmakologische Konditionierung 6

1.4 Etablierung eines Tiermodells 9

1.5 Fragestellung 10

2. Material und Methoden 11

2.1 Versuchsaufbau 11

2.2 Versuchsvorbereitung, Anästhesie und Medikation 13

2.3 Operative Versuchsdurchführung 19

2.4 Klinische Nachbeobachtung und motorische Evaluation 21

2.5 Organentnahme 23

2.6 Histologische Untersuchung und Auswertung 24

2.7 Statistische Analyse 31

3. Ergebnisse 33

3.1 Erste Versuchsdurchführung 15min Clamping 33

3.2 Reevaluation des Klemmzeitintervalls 38

3.3 Zweite Versuchsdurchführung 22min Clamping 45

3.4 Beurteilung der histologischen Färbemethoden 51

3.4 Auswertung der operativen Messparameter 59

4. Diskussion 64

4.1 Ermittlung der aortalen Klemmzeit 64

4.2 Beurteilung des Tiermodells 65

4.3 Natives - und carbamyliertes Erythropoietin 73

4.4 Alternative Strategien zur spinalen Ischämie - und Reperfusionsprophylaxe 81

5. Zusammenfassung 84
6. Literaturverzeichnis 85
Anhang
Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

AAA	abdominelles Aortenaneurysma
AKT	AKT Gen
ATP	Adenosintriphosphat
a.W.	außer Wertung
βcR	Common β receptor (Untereinheit des Heterodimers)
Ca^{2+}	Kalzium (ionisierte Form)
CD	Cluster of differentiation
cEPO	Carbamyliertes Erythropoietin
cEPO-FC	Carbamyliertes Erythropoietin Fusionsprotein
CFU-E	Colony forming unit erythroblast
Cl	Clamping
Da	Dalton (Einheit: Molekulargewicht)
DCl	Declamping
dia	diastolisch
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietin Rezeptor (Untereinheit)
$EPOR_2$	Erythropoietin Rezeptor (Homodimer) Gesamtkomplex
g	Gramm
G	Gauche (Einheit für Lumendurchmesser)
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IU	International unit
i.v.	intravenös
JAK2	Janus Kinase 2
k	Kilo (10^3)
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Mittelwert
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen activated proteinkinase
Md	Medianwert

Abkürzungsverzeichnis

mg	Milligramm
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Einheit Stoffmenge
n	Anzahl (Statistik)
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nmol	Nano Mol (10^{-9} mol)
NO	Stickstoffmonoxid
NPZ	Neuronale Progenitorzellen
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pmol	Piko Mol (10^{-12} mol)
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoietin (natives EPO)
RRsys	Systemischer Blutdruck
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde(n)
SOD	Superoxiddismutase
Spearman r	Spearman Rangkorrelationskoeffizient
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
sys	systolisch
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
vs.	versus (gegen, im Vergleich zu)
XO	Xanthinoxidase

1. Einleitung

1.1 Ätiologie und Therapie des Aortenaneurysmas

Operative Eingriffe an der Aorta sind bei Verletzungen, Aneurysmen und Dissektionen erforderlich. Die Anzahl der an Aortenaneurysmen (Gefäßwandaussackungen) Erkrankten steigt in den Industrienationen beständig an und ist vor allem auf Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Arteriosklerose, Hyperlipoproteinämie, Nikotinkonsum und hohes Alter zurückzuführen. Im Rahmen der ADAM Studie an 52745 Senioren im Alter von 50-79 wurden bei 1,2% Aortenaneurysmen mit Durchmessern über 4cm gefunden [93] .

Die U.K. Small Aneurysma Trial Studie hat gezeigt, dass Aortenrupturen in 76% der Fälle bei Aneurysmen mit einem Lumendurchmesser über 5cm auftreten. Abdominelle Aortenaneurysmen mit einem maximalen Gefäßdurchmesser von 4,0- 5,5cm haben ein jährliches Rupturrisiko von ca. 1%. In einem Beobachtungszeitraum von 3 Jahren betrug die Rupturgefahr 2,2% [21].

Andere Studien gehen von höheren Rupturrisiken aus. Vardulaki et al. berechnete für abdominelle Aortenaneurysmen mit 4,5cm Durchmesser ein maximales Rupturrisiko von 20,5% in einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren [150].

Die Gefahr einer Spontanruptur bei Aneurysmen oder Dissektionen kann durch eine chirurgische Intervention gesenkt werden. Je nach Lokalisation und Dringlichkeit kommen endovaskuläre oder offen-chirurgische Verfahren zum Einsatz.

Bei der endovaskulären Therapieoption werden über die Leistenarterien Führungskatheter zum Aneurysma eingeführt. Unter angiographischer Röntgenkontrolle wird eine Endoprothese (Stent) im betroffenen Gefäßabschnitt freigesetzt und das Aneurysma dadurch ausgeschaltet. In einer retrospektiven Studie von Scharrer-Palmer et al. war von 60 Patienten mit abdominellen Aortenaneurysmen eine endovaskuläre Versorgung in 51% der Fälle möglich [130].

In einigen Fällen ist ein offen-chirurgischer Eingriff erforderlich, um Aneurysmen oder Dissektionen zu beheben. Dabei wird der erkrankte Gefäßabschnitt durch eine Prothese ersetzt, was ein temporäres Ausklemmen oberhalb und unterhalb der Läsion erfordert [111].

Bei der offen-chirurgischen Versorgung eines abdominellen Aortenaneurysmas (AAA) betrug die perioperative Sterblichkeitsrate in den vergangenen Jahren 1,3 – 8,2% [16, 17, 67].

Ursächlich hierfür ist weitestgehend eine Störung der Hämodynamik, die durch das Aortenclamping hervorgerufen wird. Der Blutdruck steigt durch die Gefäßausklemmung stark an. Eine medikamentöse Senkung des arteriellen Blutdrucks während der Operation ist nötig, um lebensbedrohliche Komplikationen, wie ein Lungenödem oder einen Kreislaufstillstand, zu verhindern [157].

Mit zunehmender Clampingzeit kommt es distal der Gefäßklemme zu einer ischämisch-anaeroben Stoffwechsellage. Durch die sich anschließende Reperfusion werden insbesondere Leber, Nieren, Milz, Darm und Rückenmark zusätzlich geschädigt.

Eine der relevantesten Komplikationen nach komplex-chirurgischen Operationen der thorakalen Aorta ist die spinale Ischämie mit den klinischen Folgen einer Querschnittslähmung. Patienten müssen vor Gefäßeingriffen der thorakalen Aorta über das Risiko einer Querschnittslähmung aufgeklärt werden.

Strategien zur Prophylaxe von Ischämie - und Reperfusionsschäden des Rückenmarks umfassen in der gefäßchirurgischen Praxis verschiedene Ansätze [57, 140]:

- Extrakorporale Perfusion der Aorta (Aufrechterhaltung der Durchblutung während des Clampings)
- Lokale Hypothermie des Rückenmarks [142] (Senkung der ischämischen Vulnerabilität durch Minderung des metabolischen Stoffwechsels)
- Postoperative Liquordrainage und Blutdruckregulation (Senkung des spinalen Liquordruckes und Aufrechterhaltung einer spinalen Perfusion)
- Perioperative Ableitung von somatosensorisch und/oder motorisch evozierten Potentialen (Frühdetektion spinaler Ischämien)
- Pharmakologische Konditionierungen zur Prävention von Ischämie - und Reperfusionsschäden (in Erprobung)

Das deutsche Ärzteblatt spricht in diesem Zusammenhang vom „Dilemma der spinalen Ischämie“ [54]. Daher kommt der Erprobung pharmakologischer Wirkstoffe, zur Prävention spinaler Ischämien nach aortalem Crossclamping, eine wichtige klinische Bedeutung zu.

1.2 Pathophysiologie der ischämischen Rückenmarksschädigung

Eine ischämische Schädigung des Rückenmarks ist die häufigste Komplikation nach operativen Eingriffen an der thorakalen, beziehungsweise thorakoabdominalen Aorta. Die Inzidenz der ischämisch bedingten Paraplegie beträgt, in Abhängigkeit von Genese, Aneurysmaausdehnung und vorliegenden Komorbiditäten, 0,5% bei begrenztem Gefäßersatz (z.B. Aortenbogen) und bis zu 40% im Falle eines rupturierten thorakalen Aortenaneurysmas [105, 141, 167].

Beim aortalen Clamping wird der Blutfluss zum Rückenmark vermindert. Die A. spinalis anterior versorgt beim Menschen die vorderen Anteile der weißen Substanz und motorische Areale der grauen Substanz. Eine wichtige Segmentarterie beim Menschen ist die Adamkiewicz Arterie, deren Anteil an der Blutversorgung des lumbalen Rückenmarks eine hohe Variabilität aufweist. Man spricht im Zusammenhang von motorischen Ausfällen nach Aortenokklusion auch vom Spinalis anterior Syndrom.

Als Ursache der postoperativen Paraplegie werden die Ischämie (Hypoxie) und ein anschließender Reperfusionsschaden mit spinaler Ödementwicklung experimentell untersucht [14, 33, 167]. Insbesondere das Rückenmark und die stoffwechselaktiven anterioren Motoneurone sind von einer hypoxischen Schädigung betroffen [128]. Es konnte gezeigt werden, dass ab einer aortalen Klemmzeit von 30min neurologische Ausfallerscheinungen beim Menschen überproportional ansteigen [63, 123, 155].

Unter hypoxischen Bedingungen führt eine Verstoffwechslung von Adenosintriphosphat (ATP) zur Anreicherung von Adenosin, Hypoxanthin, Xanthin, Purinen und freien Sauerstoffradikalen. Durch den Abbau von Purinen entstehen Hypoxanthin und Xanthin, die durch das Enzym Xanthinoxidase zu zytotoxischen Sauerstoffradikalen oxydiert werden (siehe Abbildung 1). Diese können eine ischämische Schädigung potenzieren [1, 55].

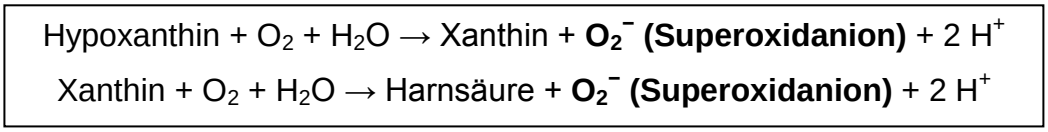

Abbildung 1: Verstoffwechslung von Xanthin und Hypoxanthin durch das Enzym Xanthinoxidase (XO)

Durch die Umwandlung von Sauerstoff (O_2), Wasser (H_2O), Hypoxanthin und Xanthin wird die Produktion von Superoxidanionen gesteigert. Diese sind an der Schädigung von Proteinen und des Genoms beteiligt (oxidativer Stress). Als Endprodukt entstehen des Weiteren Wasserstoffkationen (H+).

Allopurinol, ein Inhibitor der Xanthinoxidase, konnte in einigen experimentellen Studien einen ischämischen Schaden reduzieren [116, 161]. Zelluläre Kompensationsmechanismen zur Eliminierung freier Sauerstoffradikale spielen eine wichtige Rolle zur Protektion des Rückenmarks nach Aortenausklemmung. Pufferenzyme, wie z.B. die Superoxiddismutase (siehe Abbildung 2), konnten die ischämische Toleranz des Rückenmarks steigern [55].

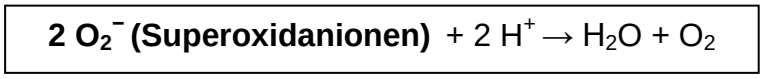

Abbildung 2: Enzymatische Reaktion von Superoxiddismutase (SOD)

Durch die enzymatische Eliminierung von reaktiven Sauerstoffradikalen kann die zelluläre Schädigung verhindert werden. Als Endprodukte entstehen Wasser (H2O) und Sauerstoff (O2).

Metallothioneine, ubiquitär vorkommende zytoplasmatische Proteine, könnten unter ischämischen Bedingungen als zelluläre Schutzmechanismen fungieren. Durch ihren hohen Anteil an Cysteinresten werden Superoxidanionen und weitere reaktive Sauerstoffspezies gebunden und unschädlich gemacht [87]. Wakida et al.

zeigten 2007 in einer experimentellen Arbeit, dass Metallothionein Knockout Mäuse nach Okklusion der A. cerebri media im Vergleich zur Wildtypspezies einen stärkeren ischämischen Schaden des Gehirns erleiden. Nach systemischer Applikation von Erythropoietin konnte eine erhöhte Expression von Metallothioneinproteinen im Cortex cerebri der Wildtyptiere nachgewiesen werden. Der neuronale Schaden wurde durch eine Applikation von Erythropoietin reduziert. Knockout Mäuse profitierten hingegen nicht von einer Erythropoietingabe [156].
Daneben werden in der Literatur weitere Mechanismen diskutiert.
Unter ischämischen Bedingungen wird der zelluläre Energiespeicher Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht. Dadurch kommt es zu einer Dysfunktion von Ionenpumpen der Zellmembran und einem Verlust des Membranpotentials (anoxische Depolarisation) [159]. Die Dysbalance der zellulären Ionen führt im weiteren Verlauf zu einer intrazellulären Hyperkaliämie, einem Zellödem und einer zellulären Azidose [3, 4, 119].
Unter hypoxischen Bedingungen soll auch der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat zytotoxische Wirkungen aufweisen [28, 29, 159]. Glutamat trägt, sowohl durch eine direkte neuronale Überstimulation, als auch indirekt durch einen erhöhten zellulären Kalziumeinstrom zu einem ischämischen Zelltod bei [29].
Erstgenannter Mechanismus wird durch eine Exozytose synaptischer Glutamatvesikel erklärt, mit der Folge einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass ein extrazelluläres Überangebot an exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat neuronale Zellen zerstört (Exzitotoxizität) [26, 100, 110]. Die extrazelluläre Konzentration von Glutamat steigt unter hypoxischen Bedingungen an [13, 26, 59], was zu einer Schädigung neuronaler Zellen führt [26, 27]. Kawakami et al. konnten 2001 in einem Zellkulturmodell zeigen, dass Erythropoietin, auch auf Ebene des glutamatinduzierten Schädigungsmechanismus, eine protektive Wirkung aufweist. Insbesondere durch eine Verhinderung der Glutamatexozytose soll Erythropoietin den ischämischen Zelltod verhindern können [79].

1.3 Prophylaxe durch pharmakologische Konditionierung

Bis jetzt wurden zahlreiche neuroprotektive Wirkstoffe zur Reduktion eines spinalen Ischämie - und Reperfusionsschadens untersucht. Keine Substanz wurde bisher in der klinischen Praxis der Gefäßchirurgie zugelassen.

In diesem Zusammenhang hat Erythropoietin (EPO) an Bedeutung gewonnen, da es weitere als die bisher bekannten erythropoietischen Eigenschaften besitzt. Neuronale Schäden konnten in Zellkulturen und tierexperimentellen Studien gemindert werden. Erythropoietin wurden neuroprotektive, antiapoptotische, antioxidative, angiogenetische und neurotropische Effekte zugesprochen [30, 56, 95, 101, 137, 153].

Erythropoietin ist zur Behandlung renaler Anämien beim Menschen zugelassen. In diesem Zusammenhang wurden Nebenwirkungen beobachtet, die sich nachteilig auf die Therapie von Aneurysmen auswirken könnten. Insbesondere kam es dosisabhängig und vorwiegend unter Langzeittherapie zu einer Blutdruckerhöhung mit Verschlechterung einer vorbestehenden Hypertonie [68, 117, 151].

Inwiefern eine perioperative Einmalgabe von Erythropoietin zu Blutdruckentgleisugen bei offen-chirurgischen Aneurysmaausschaltungen führt, bleibt, bei ausbleibender klinischer Erprobung, unklar. In seltenen Fällen kann es aber unter Erythropoietingabe zu einer erhöhten Thrombosegefahr kommen [146], was sich nachteilig auf den postoperativen Krankheitsverlauf auswirken würde.

Durch die Kopplung zweier rekombinanter humaner Erythropoietin Moleküle (rhEPO) an die konstante Region eines humanen IgG1-Antikörpers (Fc Einheit) entsteht ein EPO-FC Peptid (siehe Abbildung 3). Das Molekulargewicht des EPO-FC Peptids (EPO-FC) ist mit 112kDa deutlich größer als das des rhEPO Moleküls (30,4kDa) [132]. Das Peptid hat durch die größere Komplexizität des Moleküls und des dadurch verlangsamten Abbaus eine verlängerte Wirksamkeit im Vergleich zum nativen Erythropoietin.

Durch die Reaktion von Isocyansäure (H-N=C=O) mit dem Amino-Terminus des EPO-FC Peptids entsteht die carbamylierte Form des EPO-FC Peptids (cEPO-FC). Durch diese Carbamylierung verliert das Erythropoietin seine hämatologische Wirkung unter Beibehaltung der genannten zytoprotektiven Eigenschaften. Potenz

und Effektivität der zellulären Neuroprotektion sind mit dem des nativen Erythropoietins vergleichbar [95].

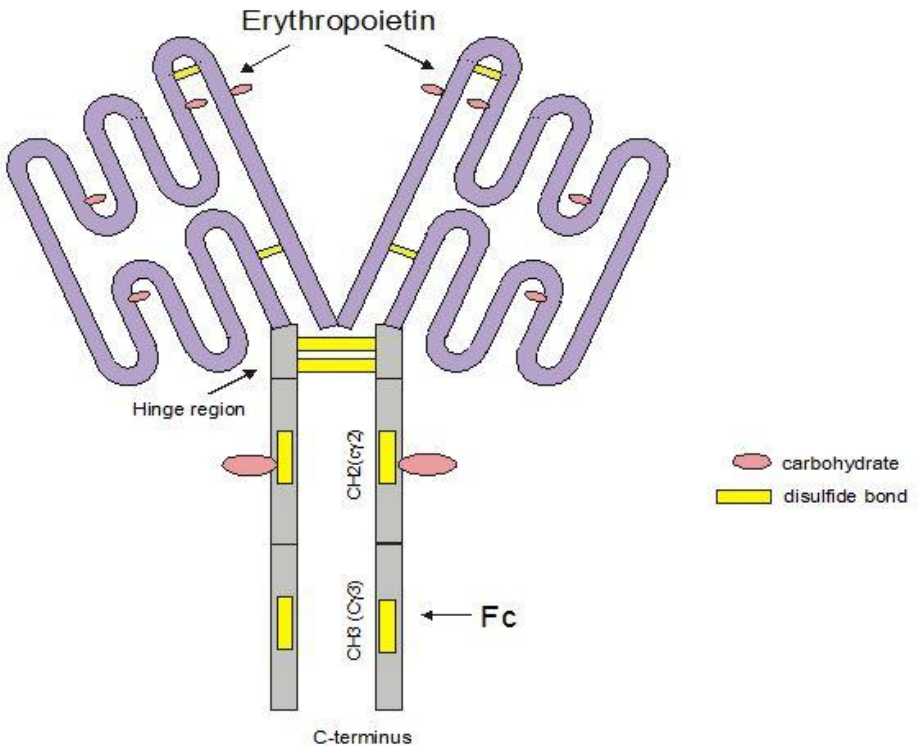

Abbildung 3: Aufbau des EPO-FC Peptids

Zwei rekombinante humane Erythropoietin Moleküle werden mit der FC- Domäne eines menschlichen IgG1 Antikörpers verbunden. Das Fusionspeptid verspricht eine längere biologische Wirkdauer als das native Erythropoietin. Durch Carbamylierung des Fusionspeptids entsteht das cEPO-FC (hier nicht abgebildet).

Quelle: Informationsbroschüre Polymun Scientific GmbH

Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Polymun Scientific GmbH, Wien, Österreich

Das carbamylierte EPO Derivat bindet nicht am klassischen EPO-Rezeptor ($EPOR_2$ Homodimer) sondern an einem Heterodimerkomplex mit einer β-Rezeptoruntereinheit (EPOR + βcR). Dieser Rezeptor ist für die zytoprotektiven Eigenschaften verantwortlich. Die bekannten Nebenwirkungen des nativen Erythropoietins sind nach Stimulation des heterodimeren Rezeptors nicht zu erwarten [18, 31]. Knockout Mäuse ohne diesen Rezeptorsubtyp zeigten keine

zytoprotektiven Effekte [19]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass cEPO auch außerhalb des nervalen Systems antiapoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Ratten mit herbeigeführten Myokardinfarkten wurden auf linksventrikuläre Funktion, Remodelling und Myokardnarbengröße untersucht. Die cEPO Gruppe erreichte im Vergleich zur Placebogruppe ein deutlich besseres Outcome [48, 106].

Tabelle 1 vergleicht die Wirkungen von Erythropoietin auf das hämatologische und neuronale System (modifiziert aus [109]):

Tabelle 1: Wirkungen von Erythropoietin auf das hämatologische und neuronale System nach Stimulierung der spezifischen Rezeptorsubtypen (modifiziert aus [109])

CD131: Cluster of differentiation 131

JAK2/ STAT5: Janus Kinase 2/ Signal transducer and activator of transcription 5

PI3K/ AKT: Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Akt Gen

NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

CFU-E: Colony forming unit erythroblast

	Hämatopoese	Nervensystem
EPO Rezeptor Expression	Erythroide Vorläuferzellen	Neuronale Progenitorzellen (NPZ), Neurone, Endothelzellen
EPO Rezeptortyp	**Homodimer** $EPOR_2$	**Heterodimer** (CD131) (EPOR + βcR)
Rezeptor Affinität	**EPO** (cEPO)	**cEPO** (EPO)
EPO Produktion	Niere, (Leber) (endokrin)	Astrozyten (parakrin), Neurone (autokrin)
Rezeptor Signaling	JAK2/ STAT5 PI3K/ AKT	JAK2/ STAT5 PI3K/ AKT NF-κB
Hauptfunktion	Differenzierung und Proliferation der CFU-E Linie	Antiapoptotisch (Neurone) Proliferation (NPZ)
Klinische Relevanz	Therapie der Anämie bei chron. Niereninsuffizienz	Neuroprotektion, Experimentelle Studien

Sowohl im hämatologischen als auch im neuronalen System wird die Produktion von Erythropoietin und die Expression des jeweiligen Rezeptors durch eine Hypoxie gesteigert. Auf neuronaler Ebene kann von einem endogenen zytoprotektiven Effekt ausgegangen werden.
Die Bindung von EPO an den Rezeptor EPOR führt zur Phosphorylation der Janus Kinase 2, nachfolgende Kaskaden (u.a. PI3-K und STAT5) werden aktiviert. Durch die Hemmung des Kalziumeinstromes über spannungssensitive Membrankanäle wird die Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter gesenkt. Nach Aktivierung von NF-κB über die Janus Kinase 2 und Akt/PKB resultiert eine verminderte mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und eine erhöhte Produktion antiapoptotischer Proteine der Bcl-x Familie [58]. Ohne EPO Aktivierung würde Cytochrom C ins Zytoplasma diffundieren und Caspase 1 und 3 aktivieren, was zu einer DNA-Instabilität und Externalisation von Phosphatidylserin an die Zellmembran führen würde. Phosphatidylserin an der Zelloberfläche aktiviert Entzündungszellen zur Phagozytose [58].
Zur Prävention einer spinalen Ischämie nach Crossclamping der Aorta wurde in nachfolgenden Versuchen am Kaninchen das carbamylierte Fusionsprotein (cEPO-FC) mit dem nativen Erythropoietin verglichen.

1.4 Etablierung eines Tiermodells

Diese Arbeit beschreibt die Etablierung eines Kleintiermodells (New Zealand White Rabbit) zur experimentellen Untersuchung einer spinalen Ischämie nach infrarenalem Aortenclamping.
Versuche mit Erythropoietin am „Deutschen Hausschwein“ zeigten im Hypoxiemodell nach thorakoabdominellem Crossclamping bereits protektive Effekte auf renaler und spinaler Ebene [134]. Diese Großtierversuche konnten nur als Terminalversuche umgesetzt werden. Die Beurteilung einer Effektivität von Studienmedikamenten basiert auf perioperativen Messparametern. Der Vorteil des Kaninchenmodells besteht darin, dass nach der operativen Versuchsdurchführung

klinisch-neurologische Funktionsprüfungen am wachen Tier, ergänzend zur Histologie, durchgeführt werden können.

Im Gegensatz zum Menschen findet sich anatomisch beim Kaninchen eine rein segmentale Blutversorgung des Rückenmarks. Ein Clamping der infrarenalen Aorta führt daher zu einer sicheren Rückenmarkschädigung der kaudalen Lumbalregion [166]. Die neuronale Schädigung entspricht weitestgehend der spinalen Ischämie nach thorakalem Crossclamping der Aorta beim Menschen [166]. Das operative Trauma kann im Kaninchenmodell im Vergleich zum Großtiermodell deutlich kleiner gehalten werden. Zudem entfällt durch die tiefe Klemmlokalisation ein Ischämie - und Reperfusionsschaden der Nieren und Oberbauchorgane. Der Blutdruck bleibt vor und nach dem Crossclamping dadurch stabiler [166].

In der Literatur existieren unterschiedliche Empfehlungen zur aortalen Klemmzeit, um eine spinale Ischämie am Kaninchen zu induzieren. Initial führten wir Versuche mit einem Klemmzeitintervall von 15min durch. Dieses Intervall musste, wie später erläutert, durch weitere Versuche zur Reevaluation der Clampingzeit korrigiert werden.

1.5 Fragestellung

Wir erwarten Antworten auf folgende Fragen:

1. Wie lange sollte die infrarenale Clampingzeit gewählt werden, um eine reproduzierbare spinale Ischämie beim Kaninchen zu induzieren?
2. Kann durch eine perioperative „Akutmedikation“ mit nativem oder carbamyliertem Erythropoietin (cEPO-FC) eine spinale Ischämie nach infrarenalem Aortenclamping reduziert werden?
3. Kann durch natives oder carbamyliertes Erythropoietin die klinische Funktion verbessert werden?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen klinischer Nachbeobachtung und Histologie?
5. Eignet sich das Ischämie - und Reperfusionsmodell am Kaninchen zur Testung weiterer Studienmedikamente?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Für die Versuchsdurchführung wurden Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbit“ (männlich, Gewicht ca. 3kg, Alter 3-4 Monate) verwendet. Der Versuchsplan wurde in Kooperation mit der Abteilung für Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm erstellt. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm und das Regierungspräsidium Tübingen. Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Tierforschungszentrum (TFZ) Oberberghof der Universität Ulm durchgeführt. Der beantragte Versuchsplan umfasste 6 Kontrollgruppen und 3 Studiengruppen. Die Tiere wurden nach einem zufälligen Randomisierungsplan einer entsprechenden Versuchsgruppe zugeteilt. Drei Versuche wurden in einer Gesamtzeit von circa 2 Jahren umgesetzt (siehe Tabelle 2). Die ersten Versuche wurden mit einer Klemmzeit von 15min durchgeführt. Dieses Klemmzeitintervall wurde bereits von einigen Autoren erfolgreich zur Induktion einer spinalen Ischämie beim Kaninchen angewandt [62, 82, 94]. Von 24 Tieren (n=20 überlebend) konnten insgesamt 10 Tiere für die Kontrollgruppe und 10 Tiere für die Studiengruppe (cEPO-FC) gewonnen werden.

Nach Datenauswertung musste die Klemmzeit durch weitere Kontrollversuche korrigiert werden. Dabei wurden weitere 36 Tiere mit einer aortalen Klemmzeit von 17min (5 Tiere, n= 4 überlebend), 20min (13 Tiere, n= 11 überlebend), 22min (15 Tiere, n= 10 Tiere), 25min (1 Tier, n= 1 überlebend) und 30min (2 Tiere, n= 2 überlebend) getestet.

Nach Festlegung der optimalen Klemmzeit auf 22min erfolgte eine abschließende Versuchsdurchführung an 19 Tieren. Dabei erfolgte die Testung der Studienmedikamente cEPO-FC (9 Tiere, n= 7 überlebend) und rhEPO (10 Tiere, n= 10 überlebend). Die Kontrollgruppe wurde aus den Versuchen zur Ermittlung der Klemmzeit übernommen (15 Tiere, n=10 überlebend).Insgesamt wurden 79 Tiere operiert. 65 Tiere überlebten den viertägigen Nachbeobachtungszeitraum und konnten für die statistische Auswertung verwendet werden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Gesamtübersicht aller Versuchsreihen

1. Versuchsdurchführung

Kontrollgruppe 15min Placebo (12 Tiere, n= 10 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Studiengruppe 15min cEPO-FC (12 Tiere, n= 10 überlebend)	Carbamyliertes Erythropoetin (50µg/kg KG) vor Clamping und nach Declamping [135], Infusionsdauer jeweils 30min
Σ 24 Tiere (n= 20 überlebend)	

Reevaluation der Clampingzeit

Kontrollgruppe 17min Placebo (5 Tiere, n= 4 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Kontrollgruppe 20min Placebo (13 Tiere, n= 11 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Kontrollgruppe 22min Placebo (15 Tiere, n= 10 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Kontrollgruppe 25min Placebo (1 Tier, n= 1 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Kontrollgruppe 30min Placebo (2 Tiere, n= 2 überlebend)	Placeboinfusion (20ml/h) mit physiologischer Kochsalzlösung [84, 91, 166] vor Clamping und nach Declamping, Infusionsdauer jeweils 30min
Σ 36 Tiere (n= 28 überlebend)	

2. Versuchsdurchführung

Studiengruppe 22min cEPO-FC (9 Tiere, n= 7 überlebend)	Carbamyliertes Erythropoetin (50µg/kg KG) vor Clamping und nach Declamping [135], Infusionsdauer jeweils 30min
Studiengruppe 22min EPO (10 Tiere, n= 10 überlebend)	Natives Erythropoietin (5000IU/kg KG) vor Clamping und nach Declamping [135], Infusionsdauer jeweils 30min
Σ 19 Tiere (n= 17 überlebend)	
Σ gesamt 79 (n= 65 überlebend)	

Die Tiere wurden 4 Wochen vor Versuchsbeginn am Tierforschungszentrum am Oberberghof der Universität Ulm untergebracht. Sie erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser (ad libitum), ein konstanter Tag - und Nachtrhythmus wurde durch eine zeitgesteuerte Beleuchtung eingehalten.
Die Versuchsdurchführung wird an folgendem Schema verdeutlicht (siehe Abbildung 4):

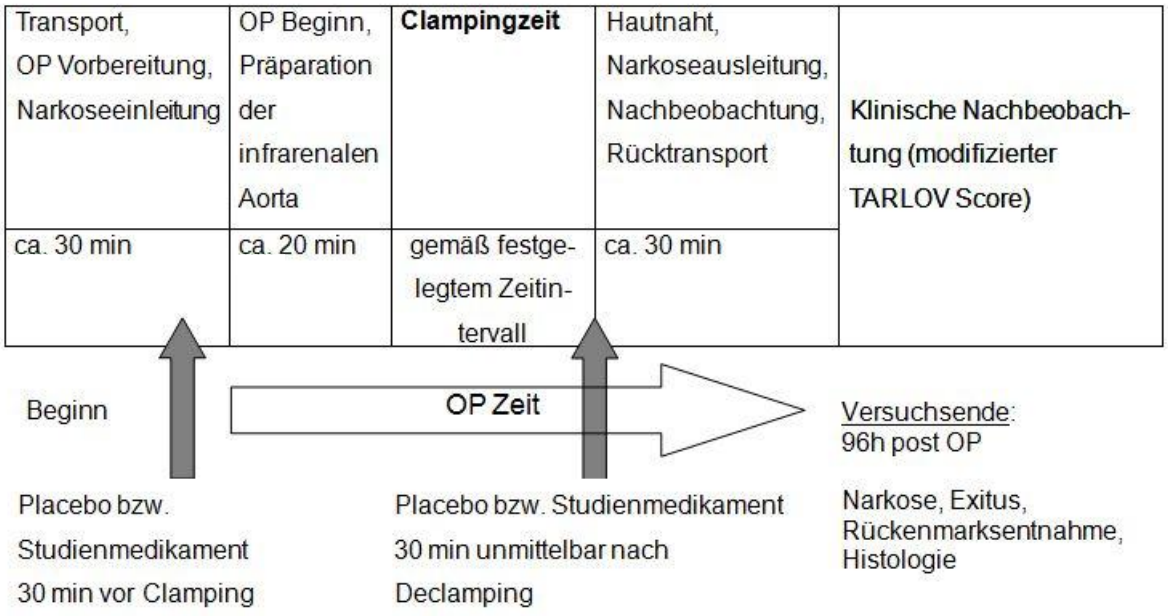

Abbildung 4: Allgemeines Zeitschema der Versuchsabläufe

2.2 Versuchsvorbereitung, Anästhesie und Medikation

Vor Operationsbeginn wurden alle Tiere gewogen und neurologisch untersucht.
Gemäß dem ermittelten Körpergewicht wurde Atropin 15min vor der geplanten Narkoseinduktion (Atropium Sulfuricum 1mg/1ml Ampulle, Eifelfango, 53474 Bad Neuenahr-Ahrweiler) in einer Dosierung von 0,2mg/kg KG subkutan verabreicht. Durch die Gabe des Parasympatholytikums sollte die bradykarde Nebenwirkung von Xylazin und eine Hypersalivation durch Ketamin gemindert werden.
Durch Kanülierung einer Ohrvene (Vasofix Safety 22G, B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen) wurde ein venöser Zugang zur Narkoseeinleitung geschaffen.

Das Narkosegemisch wurde zu Beginn eines jeden Versuchstages neu hergestellt. Es enthielt folgende Wirkstoffe:

- Ketamin 10% (Ketaminhydrochlorid, Bela-Pharm GmbH & Co KG, 49377 Vechta)
- Xylazin (Rompun, 2% Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, 51368 Leverkusen)
- NaCl Infusionslösung (isotone Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen

Zur Herstellung von 40ml Narkosegemisch wurden 10ml Ketamin (10%), 5ml Xylazin (2%) und 25ml NaCl (0,9%) verwendet.
Über den venösen Zugang (siehe Abbildung 5) erfolgte die Einleitung (50mg/kg KG Ketamin und 5mg/kg KG Xylazin) und Aufrechterhaltung der Narkose im Sinne einer totalen intravenösen Anästhesieform.
Nach Narkoseeintritt wurden die Tiere im Bereich des Abdomens rasiert und in den Operationssaal gebracht. Dort erfolgte nach sterilem Abdecken des Operationsgebietes die Hautdesinfektion des Abdomens (Freka DERM gefärbt, Dr. Schumacher GmbH, 34323 Malsfeld).
Über einen Perfusor (Pefusor Secura P, B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen) wurde gemäß Versuchsplan die Placebo - bzw. Studienmedikation appliziert. Die perioperative Konditionierung wurde 30min vor Clamping und 30min ab Beginn des Declampings verabreicht. Das native Erythropoietin (EPO: Generikum von Polymun Scientific, Immunbiologische Forschung GmbH, 1190 Wien, Österreich) und das carbamylierte Fusionsprotein (Fusionsprotein von Polymun Scientific, Immunbiologische Forschung GmbH, 1190 Wien, Österreich) wurden mit unterschiedlichen Pufferlösungen auf die gewünschte Dosierung verdünnt:

- EPO Lösung: 2,33mg/ml EPO in NaCl Puffer (isotone Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen)
  → 80,2µl EPO zu 918,8µl NaCl Puffer
- cEPO-FC Lösung: 1,83mg/ml cEPO-FC in DPBS Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco Invitrogen, PA49RF Paisley, UK)
  → 109,3µl cEPO-FC zu 890,7µl DPBS Puffer

Die Konzentration der beiden Studienmedikamente betrug dementsprechend 5000IU/kg KG (≈ 50 µg/kg KG) für EPO und 50µg/kg KG für cEPO-FC. Unter Berücksichtigung der sterisch molekularen Struktur und des Molekulargewichts von cEPO-FC, betrug die Anzahl der applizierten EPO-Untereinheiten des cEPO-FC ca. 44% der gegebenen rhEPO-Einheiten.

Die Studienmedikamente wurden jeweils vor und unmittelbar nach Ausklemmen der infrarenalen Aorta infundiert. Die Gesamtmenge der Studieninfusionslösung, beziehungsweise der applizierten Placeboinfusion, betrug pro Tier 0,25ml/kg KG. Die angewandte EPO Dosierung zeigte bereits in zahlreichen Ischämie - und Reperfusionsstudien eine neuronale Protektion [18, 77, 135, 154].

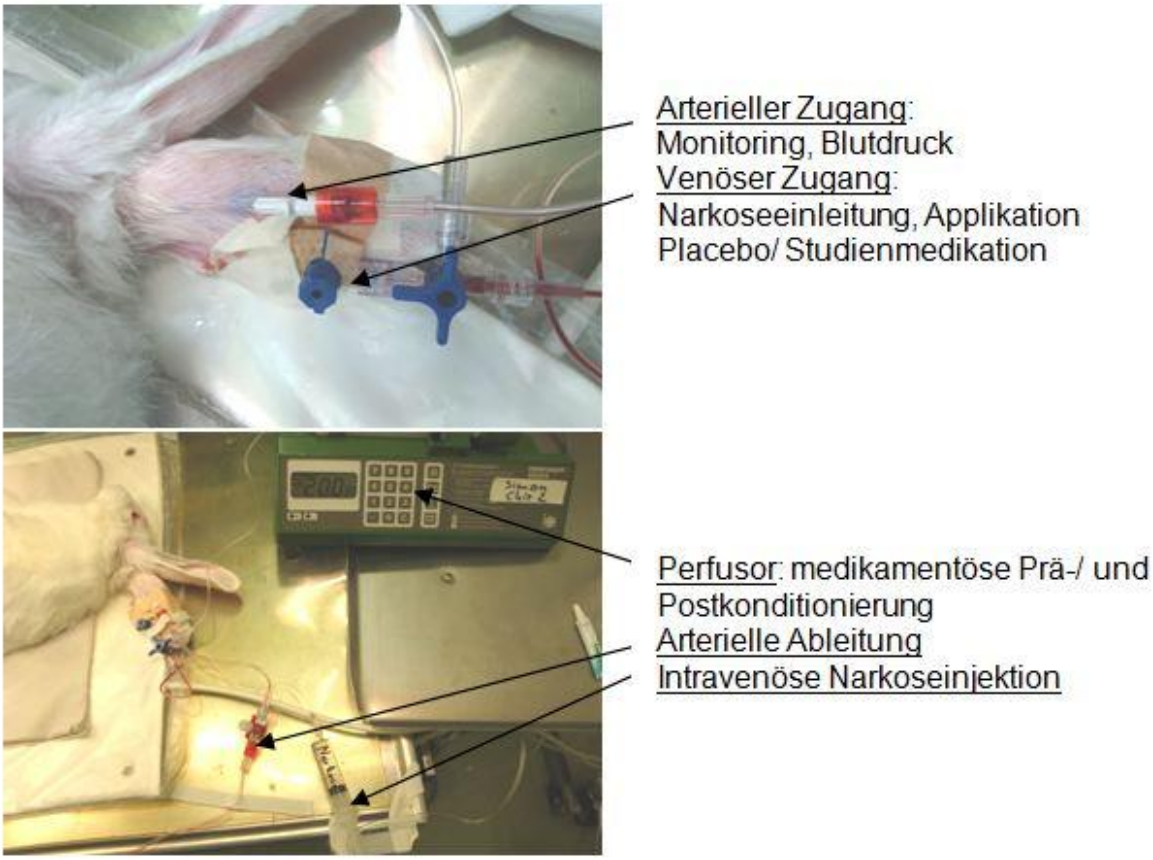

Abbildung 5: Übersicht über den venösen und arteriellen Zugangsweg

Zur perioperativen Blutdrucküberwachung wurde eine Ohrarterie punktiert (BD Insyte W, 24G, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., 84070 Utah) und an einen Druckwandler (Xtrans Druckmess Set, Codan pvb Critical Care GmbH, 85661 Forstinning) angeschlossen (siehe Abbildung 6).

Das beschriebene Narkoseregime wurde, mit Ausnahme der Applikationsart, bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen für Ischämie - und Reperfusionsuntersuchungen an Kaninchen erfolgreich angewandt [12, 84, 90, 112]. Im Tiermodell konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine intramuskuläre Applikation eines Ketamin-Xylazin Gemisches zu Muskelschwäche und Nekrosen führen kann [138]. Um die klinische Nachbeobachtung nicht zu beeinträchtigen, wurde in unserem Modell auf diese Narkoseapplikationsform verzichtet. Bei gleichem Narkosegemisch wählten wir eine total intravenöse Anästhesieform.

Die Narkosetiefe der Tiere wurde perioperativ kontinuierlich durch Provokation des Augenlidschlußreflexes überprüft. Bei Bedarf konnten rechtzeitig Narkosebolusgaben zur Vertiefung der Narkose verabreicht werden.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde während der Operation mit einer Rektalsonde überwacht und mit einer Heizmatte konstant bei ca. 38°C gehalten. Nachdem das Operationsfeld steril abgedeckt und das Abdomen des Kaninchens desinfiziert worden war, folgte, nach Erfassung der Monitoring Parameter (arterieller Blutdruck, Körpertemperatur und Herzfrequenz), das Eröffnen des Abdomens mittels medianer Laparotomie (siehe Abbildung 6).

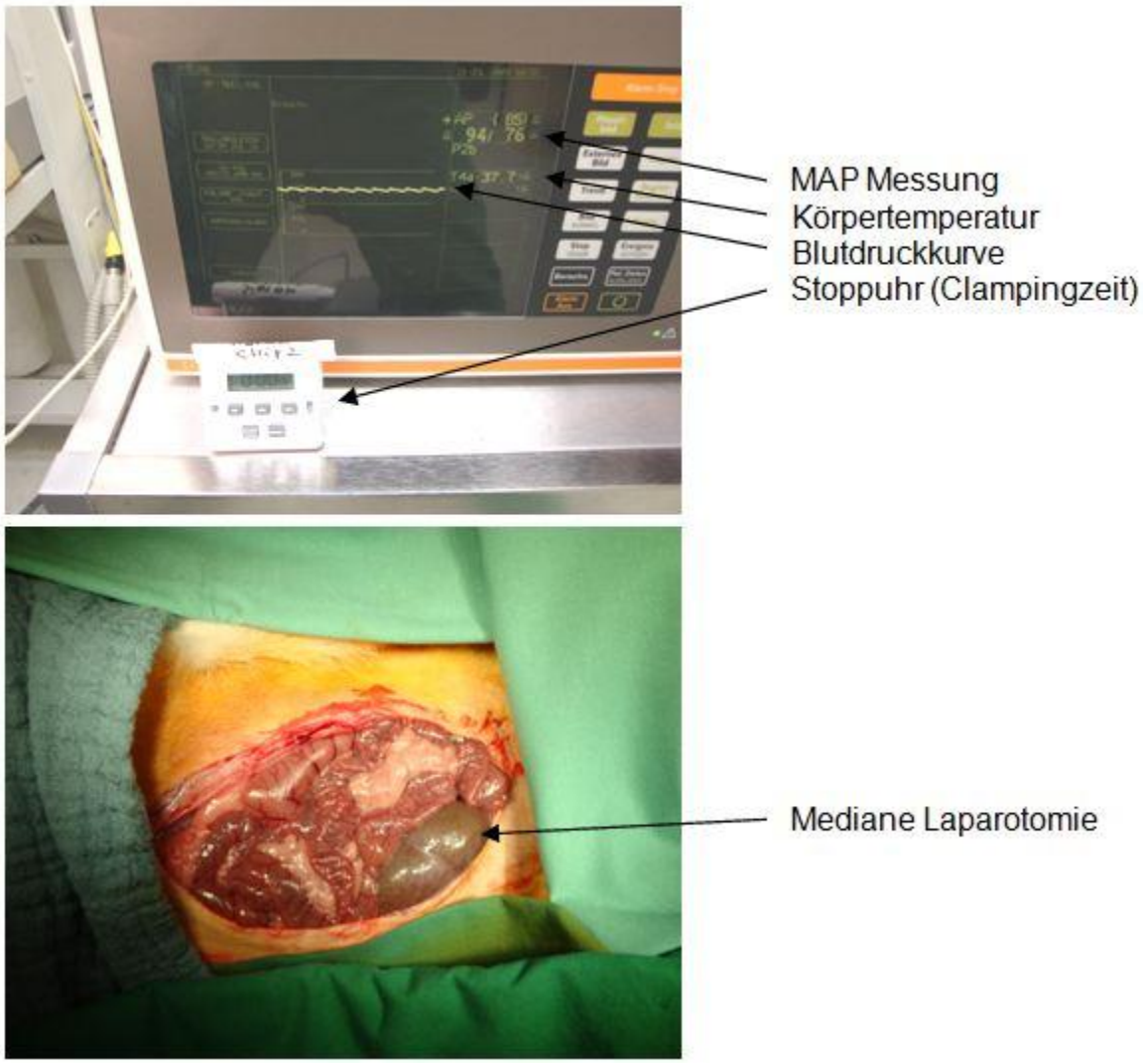

Abbildung 6: Perioperative Überwachung der Vitalparameter und Darstellung der medianen Laparotomie

Alle angewandten Medikamente und Dosierungen des Versuchsablaufes werden in Tabelle 3 zusammengefasst:

Tabelle 3: Gesamtübersicht über Medikamente und Dosierungen

Medikation vor OP:	**Dosierung:**	**Bemerkung:**
Atropin	0,2mg/kg KG, subkutan	Prämedikation vor Narkose-einleitung
Carprofen	4mg/kg KG, subkutan	Schmerztherapie
Ketamin 10% (Narkosegemisch)	50mg/kg KG, intravenös	Narkoseeinleitung
Xylazin (Narkosegemisch)	5mg/kg KG, intravenös	Narkoseeinleitung
Studienmedikation	Placebo Gruppe: 20ml/h NaCl Lösung cEPO-FC Gruppe: Carbamyliertes Erythropoietin 50µg/kg KG, gelöst in Pufferlö-sung (PBS 1%) EPO Gruppe: Natives Erythropoietin 5000IU/kg KG, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung	Infusionsdauer 30min vor Clamping
Medikation während der OP:		
Heparin	150IU/kg KG, intravenös vor Aortenclamping	Antikoagulation
Ketamin 10% (Narkosegemisch)	50mg/kg KG, intravenös, bei Bedarf	Narkoseaufrechterhaltung
Xylazin (Narkosegemisch)	5mg/kg KG, intravenös, bei Bedarf	Narkoseaufrechterhaltung
Studienmedikation	Placebo Gruppe: 20ml/h NaCl Lösung cEPO-FC Gruppe: Carbamyliertes Erythropoietin 50µg/kg KG, gelöst in Pufferlö-sung (PBS 1%) EPO Gruppe: Natives Erythropoietin 5000IU/kg KG, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung	Infusionsdauer 30min direkt nach Declamping
Medikation nach der OP:		
Carprofen	4mg/kg KG, subkutan, alle 12h	Postoperative Schmerzthe-rapie

Midazolam (ab der zweiten Versuchsdurchführung)	0,5mg/kg KG, i.v. postoperativ nach Abklingen der Narkose (einmalige Gabe)	Postoperative neurologische Krampfprophylaxe
Medikation zur Organentnahme:		
Atropin	0,2mg/kg KG, subkutan	Prämedikation vor Narkose-einleitung
Ketamin 10% (Narkosegemisch)	50mg/kg KG, intravenös	Narkoseeinleitung
Xylazin (Narkosegemisch)	5mg/kg KG, intravenös	Narkoseeinleitung
Kaliumchlorid (KCl)	1molar, 20ml	Tötung (Herzstillstand)

2.3 Operative Versuchsdurchführung

Nach Eröffnung des Abdomens über eine mediane Inzision von ca. 12cm wurde der Darm auf ein steril befeuchtetes Tuch nach rechts ausgelagert. Das retroperitoneale Fettgewebe konnte auf diese Weise dargestellt werden.
Druckparameter und Temperatur wurden kontinuierlich überwacht und in einem Intervall von 5min dokumentiert.
Die beiden Clampingstellen der abdominellen Aorta, distal des Abgangs der Nierenarterien und proximal der Aortenbifurkation, wurden aus dem Retroperitoneum freipräpariert. Nach vollständiger Infusion der Gruppenmedikation wurde zur Antikoagulation vor Aortenausklemmung humanes Heparin (Heparin Natrium „Multi“, 10000IE/ml, B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) in einer Dosierung von 150IU/kg KG intravenös als Bolus verabreicht. Die Aorta wurde anschließend mittels Minibulldog Gefäßklemmen (Dieffenbach Gefäßklemme 35mm gerade) an beiden präparierten Stellen simultan ausgeklemmt (siehe Abbildung 7). Nach Platzieren der Gefäßklemmen wurde durch taktile Kontrolle die Pulslosigkeit über dem ausgeklemmten Gefäßabschnitt bestätigt.
Arterielle Blutdruckwerte wurden unmittelbar vor und nach dem Clamping erfasst. Der maximale Blutdruckanstieg nach Clamping sowie der maximale Blutdruckabfall nach Declamping konnte eindeutig ermittelt werden.
Nach Ablauf der aortalen Klemmzeit erfolgte die postoperative Konditionierung mittels Studienmedikament - bzw. Placeboinfusion. Der Darm wurde repositioniert

und das Abdomen mittels zweier Subkutan - und einer Intrakutannaht (Fasziennaht: Vicryl 4-0, Polyglactin 910; Hautnaht: Polypropylen 3-0, Ethicon Johnson & Johnson Medical GmbH, 22851 Norderstedt) schichtweise verschlossen.

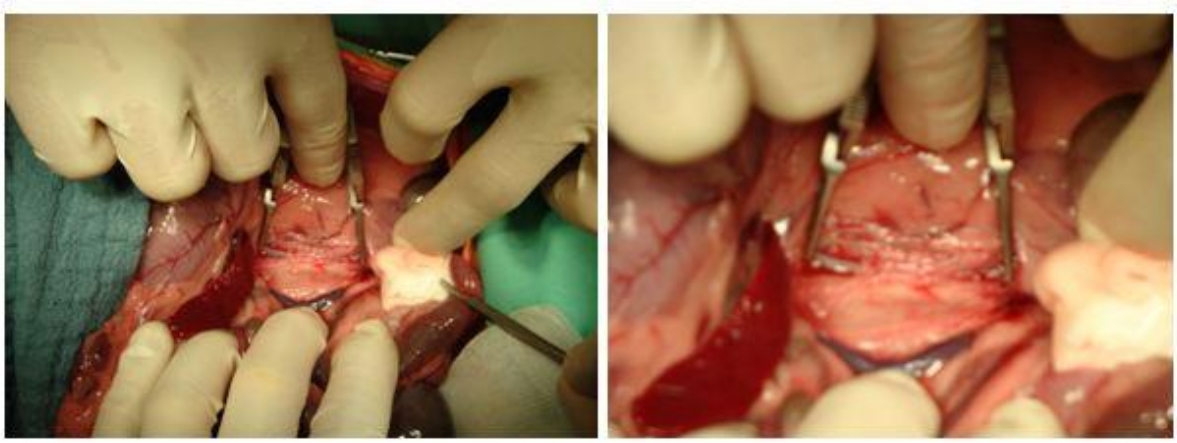

Abbildung 7: Doppelte Ausklemmung der infrarenalen Aorta

Nach Narkoseende wurde der arterielle Katheter entfernt. Zur postoperativen Schmerzmedikation diente Carprofen (Rimadyl 1000mg/ 20ml Ampulle, Pfizer GmbH, 10785 Berlin) in einer Dosierung von 4 mg/kg KG intrakutan. Der venöse Zugang wurde bis zur Organentnahme am vierten Tag belassen.
Die Applikation von Carprofen zur postoperativen Analgesie erfolgte alle 12h.
Mit zunehmender Dauer der Klemmzeit musste mit neurologischen Streckkrämpfen gerechnet werden. Nach der ersten Versuchsdurchführung wurde standardmäßig eine postoperative Krampfprophylaxe mit Midazolam (Midazolam 5mg/ 5ml, Ratiopharm, 89070 Ulm) durchgeführt. Die Applikation erfolgte 1h nach Beendigung der Operation in einer Dosierung von 0,5 mg/kg KG iv.
Zur Erholung und postoperativen Nachüberwachung wurden die Kaninchen in eine Transportkiste gegeben und bis zum Abklingen der Narkose überwacht.
Im ersten Versuchsablauf erfolgte die erste neurologische Untersuchung nach 6h. Für die nachfolgenden Versuche wurde die erste klinische Kontrolle auf 2h

vorverlegt, da nach diesem Zeitintervall klinisch von einer vollständigen Elimination der Narkosewirkstoffe auszugehen war.
Die Operationen und klinischen Nachuntersuchungen wurden insgesamt von drei ärztlichen Mitarbeitern des Ulmer Universitätsklinikums durchgeführt (Dr. med. Thiere, Dr. med. Oberhuber und Dr. med. Claußnitzer). Die anästhesiologische Überwachung erfolgte durch Herrn Dr. med. Simon. Die Operateure waren hinsichtlich der Therapiegruppeneinteilung verblindet.

2.4 Klinische Nachbeobachtung und motorische Evaluation

Im Gegensatz zu Terminalversuchen am Großtier nimmt die klinische Evaluation motorischer Fähigkeiten am wachen Tier in diesem Tiermodell eine wesentliche Rolle ein. Die Kaninchen wurden postoperativ nach einem festgelegten Zeitschema nachuntersucht, um Aussagen über die Klinik eines spinalen Schadens nach Aortenclamping zu erhalten.
Die klinische Nachbeobachtung erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Beobachtungsscores nach Tarlov, der 1972 motorische Evaluationen nach spinaler Kompression an Hunden durchführte [144].
Der modifizierte Tarlov Score des Kaninchenmodells wird in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4: Modifizierter Tarlov Score (Kaninchenmodell)

Grad:	Beschreibung:
0	komplette Paraplegie, keine Bewegung in den Hinterläufen, Sitzhaltung nicht möglich
1	leichte Bewegung der Hinterläufe können beobachtet werden, Sitzen nicht möglich
2	leichte Bewegung der Hinterläufe, Sitzposition kann für eine kurze Zeit gehalten werden, wenn eine Unterstützung durch den Untersucher erfolgt
3	Sitzen ist ohne die Hilfe des Untersuchers möglich, keine Hoppelbewegungen möglich
4	leichtes, schwaches Hoppeln wird beobachtet, entspricht aber nicht dem physiologischen Bewegungsablauf
5	normales, physiologisches Hoppeln
Bemerkung	Bei Bedarf wurden Zwischenstufen (z.B. 3-4) angewandt.

In der ersten Versuchsdurchführung wurden die Tiere im Abstand von 6h, 24h, 30h, 48h, 60h, 72h, 84h und 96h nachuntersucht. Während der zweiten Versuchsdurchführung wurden die Zeitpunkte auf 2h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h und 96h erweitert. 2h nach Operation war bei allen Tieren mit einer kompletten Narkoseerholung zu rechnen, sodass ein früherer Kontrollzeitpunkt eingeführt wurde.

In den anschließenden 12h Zeitintervallen wurden die klinischen Untersuchungen mit der Applikation von Carprofen zur Schmerzprophylaxe verknüpft.

Die motorische Evaluation erfolgte durch einen hinsichtlich des Versuchsplans verblindeten Untersucher.

Aufgrund der festgelegten Klemmlokalisation und der segmentalen Blutversorgung des Rückenmarks beim Kaninchen waren neurologische Ausfälle ausschließlich im Bereich der Hinterläufe zu erwarten. Motoneurone des Lumbalmarks innervieren wie beim Menschen die Muskeln der unteren Extremität, was die klinische Evaluation deutlich erleichtert.

2.5 Organentnahme

Am vierten postoperativen Tag (96h nach Operation) erfolgte die letzte klinische Untersuchung. Im Anschluss wurden die Tiere in den Vorbereitungsraum gebracht, um sie auf die Organentnahme vorzubereiten.
Identisch zur operativen Narkotisierung wurde den Tieren zur Prämedikation vor Narkoseeinleitung Atropin subkutan (0,2mg/kg KG) verabreicht. Über die seit Operation bestehende Venenverweilkanüle wurde das Narkosegemisch (Ketamin-Xylazin Lösung) appliziert und mit dem Rasieren der Rückenmarksregion begonnen.
Durch eine ca. 13cm lange Hautinzision über den zu tastenden Dornfortsätzen der Wirbelkörper, wurden in tiefer Anästhesie Fell und Haut von der Wirbelsäule abgelöst. Zur Tötung der Tiere folgte die intravenöse Gabe einer 1 molaren Kaliumchloridlösung (20ml, 1M Fresenius, 61346 Bad Homburg v.d.H.). Der Todeseintritt (Herzstillstand) wurde abgewartet, um das komplette knöcherne Wirbelsäulensegment zu entnehmen. Mittels feiner Zangen konnten die einzelnen Wirbelkörperspangen aufgetrennt und das Rückenmark im Ganzen entnommen werden (siehe Abbildung 8).

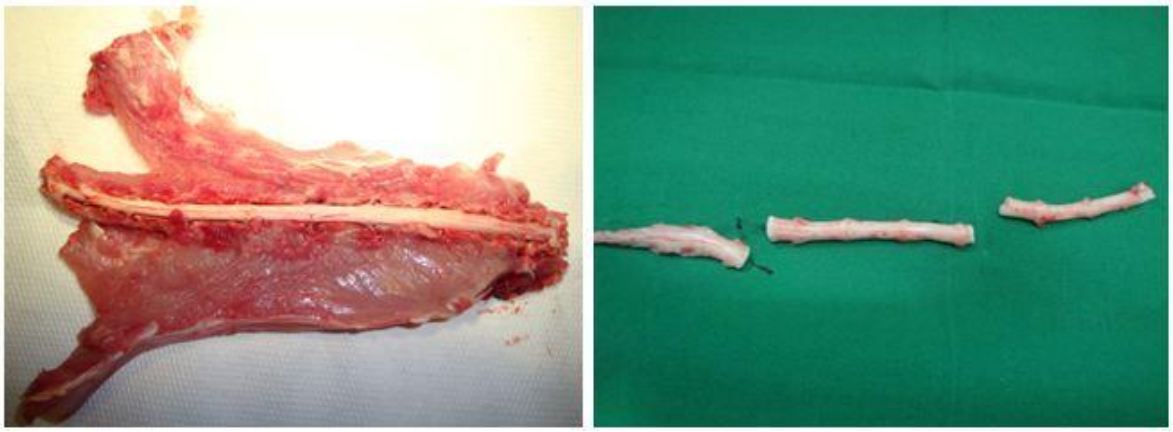

Abbildung 8: Rückenmarksentnahme am vierten postoperativen Tag
Nach Eröffnung des knöchernen Wirbelkanals (Bild links) konnte das Rückenmark in toto entnommen werden (Bild rechts).

Gemessen vom Ende der Cauda equina erfolgte die Unterteilung des Rückenmarks in 3 Segmente (lumbal, thorakolumbal und thorakal) im Abstand von jeweils 5cm (siehe Abbildung 8). Die einzelnen Rückenmarksanteile wurden zur Aufbewahrung und Konservierung in Formalinlösung (Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, Otto Fischer GmbH & Co KG, 66067 Saarbrücken) gegeben.
Die Wirbelsäule des Kaninchens besteht aus folgenden Wirbelkörpern:

- 7 Halswirbel (Nervenabgänge C1-C7)
- 13 Brustwirbel (Nervenabgänge Th1-Th13)
- 7 Lendenwirbel (Nervenabgänge L1-L7)
- 4 Kreuzwirbel (Nervenabgänge S1-S4)
- 16-18 Schwanzwirbel (Nervenabgänge Co1-C016/17/18)

Das Rückenmark wurde ab dem thorakalen Bereich (Brustwirbel) bis zur Cauda equina (Kreuzwirbel) entnommen. Die Entnahmedauer vom Todeseintritt bis zur Formalinkonservierung betrug durchschnittlich 15min.

2.6 Histologische Untersuchung und Auswertung

2.6.1 Vorbereitung und Aufarbeitung der Gewebsbiopsien

Nach 24h wurden die in Formalin konservierten Rückenmarksabschnitte in ca. 0,5cm breite Untersegmente unterteilt. Dabei wurde zwischen jedem Untersegment ein Abstand von einem Zentimeter eingehalten und die gewonnenen Organsegmente entsprechend ihrer anatomischen Lokalisation im Rückenmark nummeriert und für die histologische Entwässerung in Kassetten geschnitten (siehe Abbildung 9).

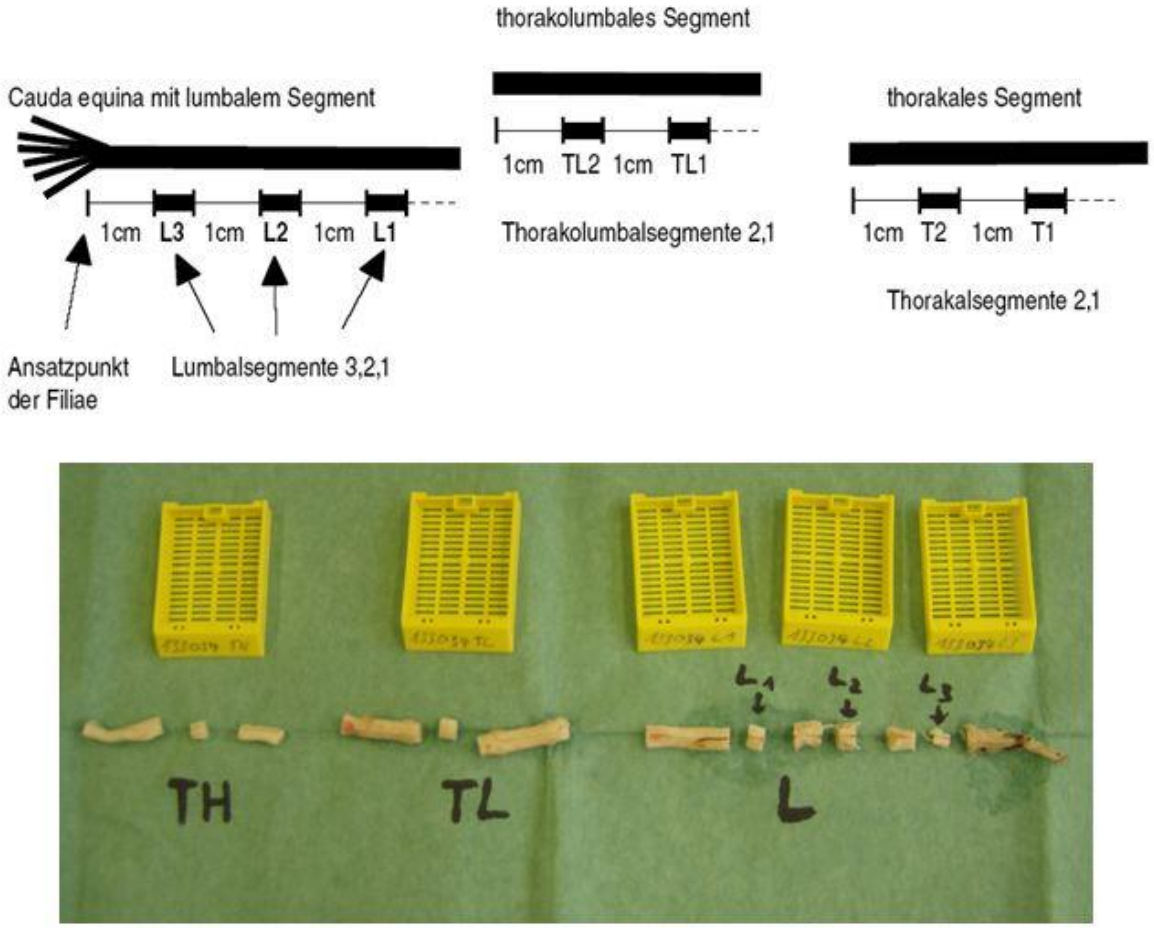

Abbildung 9: Unterteilung der Rückenmarksabschnitte in Untersegmente zur histologischen Aufarbeitung

Nach einer 48h Konservierung in Formalinlösung wurden die Gewebestücke mittels Wärmevakuummethode und ansteigender Alkoholreihe entwässert:

- Formalinbad (3,8%)
- destilliertes Wasser
- 75%iger Alkohol
- 80%iger Alkohol
- 2mal 96%iger Alkohol
- 2mal 100%iger Alkohol
- 2mal Xylollösung
- Paraffinierung (4mal)

Nach Entwässerung wurden die Gewebeproben der jeweiligen Rückenmarksbereiche orthogonal in Paraffin eingebettet. An einem Mikrotom (Leica Microtom 2030 Mot, 3557 Wetzlar) wurden 3µm dicke Paraffinschnitte gewonnen und auf Glasobjektträger (Menzel, Superfrost Plus, 38116 Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Die Entparaffinierung der Schnittpräparate erfolgte bei 80°C für 20min im Heizofen. Das übrige Paraffin wurde in einem zweimaligen Xylolbad über jeweils 10min (Merck, 64293 Darmstadt) entfernt. Nach absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 % und 75 %) für jeweils 2min wurden die Schnittpräparate den jeweiligen Färbemethoden zugeführt.

2.6.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit der pathologischen Abteilung der Universität Ulm (Leitung Herr Prof. Dr. med. Möller) an einem H&E-Färbeautomaten (Tisue Tek II, Färbeautomat, Histo Tek):

- Inkubation der Präparate in Mayers Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung, Merck, 64293 Darmstadt) für 3min
- Spülung mit Aqua destillata
- Inkubation der Präparate in Eosin (Eosin Y Lösung, Waldeck GmbH & Co KG, 48161 Münster) für 3min
- Spülung mit Aqua destillata
- Dehydration in ansteigender Ethanolreihe (75%, 96%, 100%) für je 2min
- Xylolbad für 3min
- Eindeckung der Präparate (Eukitt Automat, O. Kindler GmbH & Co, 79110 Freiburg)

Nach einer postoperativen Nachbeobachtungszeit von 96h müsste histomorphologisch mit ausgereiften Infarkten zu rechnen sein. Nach 3 Tagen zeigte sich nach Okklusion der dorsalen Rückenmarksvenen bereits im Rattenmodell eine nachweisbare axonale Degeneration [165]. Mit Hilfe der H&E Färbung können Ischämie - und Reperfusionsschäden auf spinaler Ebene kategorisiert und zur Darstellung gebracht werden.

Die H&E Färbung ist eine histologische Standardfärbung, basierend auf einer unterschiedlichen Farbstoffaffinität. Das enthaltene Hämalaun ist ein Komplex aus Aluminiumionen und dem Farbstoff Hämatein. Er bindet als basischer Farbstoff an basophilen Komponenten (z.B. RNA, DNA im Zellkern) und färbt diese blau. Der saure Farbstoff Eosin hingegen färbt zytoplasmatische Elemente (z.B. Mitochondrien und Proteine) rot.

Für die Auswertung der histologischen Präparate wurde ein Lichtmikroskop (Olympus, BX 41 TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) verwendet. Die Präparate wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Scheuerle der Abteilung für Neuropathologie des Bezirkskrankenhauses in Günzburg (Sektion der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm, Prof. Dr. med. Möller) ausgewertet. Basierend auf der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde ein histologischer Schädigungsscore entwickelt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Histologischer Beurteilungsscore basierend auf der H&E-Färbung

Neurophagie: Intravitale Zerstörung absterbender Nervenzellen (alpha Motoneurone) durch Mikroglia und phagozytierende Zellen.

Grad:	**Beschreibung:**
0	Kompletter Infarkt und Auflösung der gesamten grauen Rückenmarkssubstanz
1	Ausgeprägter Infarkt der gesamten grauen Rückenmarkssubstanz
2	Ausgeprägte diffuse Infiltration von Entzündungszellen in die graue Substanz, konfluierende Infarktzonen
3	Vereinzelte Infarktzonen der grauen Substanz, vereinzelt Neurophagie
4	Wenig Infiltration von Entzündungszellen in die graue Substanz, alpha Motoneurone erhalten
5	Physiologisches Rückenmarkspräparat
Bemerkung	Bei Bedarf wurden Zwischenstufen (z.B. 3-4) angewandt.

Entscheidend für die Kategorisierung war die Integrität der grauen Rückenmarkssubstanz und Anzahl der vitalen alpha Motoneurone.
Für jedes Tier wurden thorakale -, thorakolumbale - und 3 lumbale Präparate ausgewertet. Ein histologischer Schaden sollte aufgrund der Klemmlokalisation auf die Präparate der Lumbalsegmente begrenzt sein.
Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte in Zusammenarbeit mit einem Neuropathologen. Die Untersucher waren hinsichtlich der Versuchsgruppeneinteilung verblindet.
In Zusammenarbeit mit der neuropathologischen Abteilung des Bezirkskrankenhauses in Günzburg wurden ergänzende histologische Färbungen angefertigt.

2.6.3 Nissl-Färbung

Die Färbetechnik nach Nissl wird zur Charakterisierung von Nervenzellen angewandt.
Der Farbstoff Kresylviolett verbindet sich mit basophilen Strukturen (wie z.B. RNA oder DNA) und färbt diese dunkelviolett. Da Zellorganellen im ZNS ausschließlich im Perikaryon zu finden sind, werden Dendriten und Axone mit dieser Färbetechnik nicht zur Darstellung gebracht.
Physiologisch intakte Motoneurone der grauen Rückenmarkssubstanz zeigen unter dieser Färbung charakteristische Nissl - oder Tigroid Schollen. Diese entsprechen dem rauen endoplasmatischen Retikulum. Ein Verlust der basophilen Substanz (Tigrolyse) kann Hinweise auf geschädigte neuronale Zellen liefern.
Die Färbung der histologischen Schnittpräparate umfasste folgende Arbeitsschritte:

- Spülung mit Aqua destillata
- Spülung mit 1%iger Essigsäure
- Färbung mit gepufferter Nissl Lösung (Kresylviolett Farbstoff) für 5min
- Spülung mit 1%iger Essigsäure
- Dehydration in ansteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) für 2x 3min
- Xylolbad für 2x 5min

- Eindeckung der Präparate (Eukitt Automat, O. Kindler GmbH & Co, 79110 Freiburg)

Ergänzend zur Hämatoxylin & Eosin Färbung kann diese Färbemethode zusätzliche Aussagen über den Funktionszustand neuronaler Zellen liefern.

2.6.4 Masson-Goldner-Färbung

Diese mikroskopische Färbemethode beruht auf dem Prinzip der Dispersität kombinierter Farbstoffe (unterschiedliche Farbstoffmolekülgrößen). Sie findet ihre Verwendung bei der Darstellung einzelner Bindegewebskomponenten wie Muskelfasern, Fibrin und Kollagenfasern. Da bei dieser Methode saure Farbstoffe zum Einsatz kommen, wird eine zusätzliche Kernfärbung mittels Weigerts Eisenhämatoxylin durchgeführt.
Die Durchführung der Mason-Goldner-Trichromfärbung orientierte sich am empfohlenen Färbeprotokoll der Merck Produktbeschreibung:

- Eisenhämatoxylin nach Weigert für 5min
- Fließende Wässerung unter Leitungswasser für 2min
- Azophloxin-Lösung für 6min
- Spülung mit 1%iger Essigsäure für 30sec
- Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung für 1min
- Spülung mit 1%iger Essigsäure für 30sec
- Lichtgrün SF-Lösung für 4min
- Spülung mit 1%iger Essigsäure für 30sec
- Spülung mit Ethanol (100%)
- Xylol Spülung
- Eindeckung der Präparate (Eukitt Automat, O. Kindler GmbH & Co, 79110 Freiburg)

Nach ischämischer Schädigung des Rückenmarks könnten mit Hilfe dieser Färbung Bindegewebsreaktionen wie Sklerosierungen (Astrogliafasernarben),

Hämorrhagien oder Infarktdemarkierungsprozesse zur Darstellung gebracht werden.

2.6.5 Elastika van Gieson Färbung

Wie die Masson-Goldner-Färbung wurde diese Färbemethode zur Darstellung von Bindegewebskomponenten gewählt.
Die Elastika van Gieson Färbung ermöglicht eine Differenzierung von Kernmorphologien, Bindegewebe, Muskulatur und elastischen Fasern.
Die Durchführung der van Gieson Färbung orientierte sich am empfohlenen Färbeprotokoll der Merck Produktbeschreibung:

- Eisenhämatoxylin nach Weigert für 10min
- Spülung mit Aqua destillata
- Weigerts Lösung A und B (Verhältnis 1:1) für 5min
- Spülung in Aqua destillata
- Pikrofuchsin Lösung für 2min
- Ethanol Spülung (70%) für 1min
- Dehydration in ansteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) für 2x 3min
- Xylol Spülung
- Eindeckung der Präparate (Eukitt Automat, O. Kindler GmbH & Co, 79110 Freiburg)

Informationen aus der Masson Goldner Färbung könnten durch diese Färbung ergänzt werden.

2.6.6 Eisenfärbung

Üblicherweise wird diese histologische Färbemethode bei Eisenmangelanämien zum Nachweis von Speichereisen im Knochenmark angewandt.

Für infarktischämische Prozesse liefert die Eisenfärbung indirekte Informationen über stattgehabte Einblutungen. Hämorrhagische Infarktkomponenten werden nach Einwanderung von Makrophagen abgebaut. Mit der Eisenfärbung kann das abgebaute Hämoglobin in Form von Hämosiderin in Makrophagen nachgewiesen werden.
Die Färbung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums in Ulm wie folgt durchgeführt:

- Inkubation mit Kaliumhexacyanoferratlösung (1g Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat, 100ml Aqua destillata, 1ml 25%ige HCl Lösung) für 5min
- Spülung mit Aqua destillata
- Färbung mit Kernechtrot für 5min
- Spülung mit Aqua destillata
- Dehydration in ansteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100 %)
- Xylol Spülung
- Eindeckung der Präparate (Eukitt Automat, O. Kindler GmbH & Co, 79110 Freiburg)

Durch die Eisenfärbung wären nach 96h klinischer Nachbeobachtungszeit hämorrhagisch stattgehabte Infarktkomponenten durch die Detektion von Siederophagen zu belegen.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).
Zur Auswertung wurden folgende statistische Tests angewandt:

- Median - bzw. Mittelwertberechnungen der Tarlov Werte (Ermittlung der optimalen Klemmzeit zur Provokation einer spinalen Ischämie beim Kaninchen)
- Mann Whitney Rank Sum Test (Vergleich von 2 unabhängigen Gruppen)
- Kruskal-Wallis Test (Vergleich von mehreren unabhängigen Gruppen)

- Spearman Korrelationstest (Vergleich zweier Variablen hinsichtlich einer Abhängigkeit)

Statistische Ergebnisse für $p < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5%) wurden als signifikant gewertet und im Text unterstrichen dargestellt.
Zahlenergebnisse in Tabellenform wurden auf die jeweilige Stelle nach dem Komma gerundet.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 79 Tiere in drei Versuchsdurchführungen, wie oben beschrieben, operiert und nachuntersucht. Davon wurden 48 Tiere (38 Tiere überlebend) zur Ermittlung der optimalen Klemmzeit und für die entsprechenden Kontrollgruppen benötigt. An den verbleibenden 31 Tieren (27 Tiere überlebend) wurden die Studienmedikamente (EPO und cEPO-FC) zur Prävention einer spinalen Ischämie nach Aortenclamping getestet.

3.1 Erste Versuchsdurchführung 15min Clamping

3.1.1 Klinische Auswertung

Die Ergebnisse des ersten Versuchsablaufes wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert [145]. Bei 24 Tieren (20 Tiere überlebend) wurde eine Clampingzeit von 15min festgelegt und eine Kontrollgruppe (n= 12) mit einer Studiengruppe (cEPO-FC; n= 12) verglichen. Diese Klemmzeit wurde in der Literatur bereits mehrfach zur Induktion einer spinalen Ischämie beim Kaninchen erfolgreich angewendet [62, 82, 94]. Je Gruppe verstarben 2 Tiere während des postoperativen Verlaufs. Eine Ursache des vorzeitigen Versterbens konnte in der tierärztlichen Obduktion nicht gefunden und ein operationstechnischer Fehler ausgeschlossen werden. In der ersten Versuchsdurchführung ergaben sich somit 2 Versuchsgruppen mit einer Gruppenstärke von jeweils 10 Tieren (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Erster Versuchsablauf (15min Clampingzeit)

Kontrollgruppe 15min Placebo (12 Tiere, n= 10 überlebend)
Studiengruppe 15min cEPO-FC (12 Tiere, n= 10 überlebend)
Σ 24 Tiere (n= 20 überlebend)

Alle Tiere zeigten vor der Operation einen physiologischen neuronalen Status (Tarlov 5). In beiden Gruppen wurde unmittelbar nach aortalem Crossclamping ein Tarlov Medianwert von 0 beobachtet, was einer kompletten Paraplegie der Hinterläufe entspricht.

Die nächste klinische Untersuchung erfolgte nach 6h. Hier zeigte sich im Vergleich zum 0h Zeitpunkt eine höchst signifikante Verbesserung der motorischen Funktion (Kontrolle 15 min: Md (0h) 0,00; Md (6h) 4,25; p= 0,0003 / cEPO-FC 15 min: Md (0h) 0,00; Md (6h) 4,00; p< 0,0001, Mann Whitney Test).

In der Kontrollgruppe war zum Zeitpunkt 6h der maximale Tarlov Medianwert erreicht. Im weiteren Verlauf kam es zu einer zunehmenden Verschlechterung der motorischen Funktion (siehe Abbildung 10). Zum Endzeitpunkt bei 96h betrug der Tarlov Medianwert 3,63.

Einen ähnlichen Verlauf zeigte die cEPO-FC Studiengruppe. Nach postoperativer Plegie der Hinterläufe erholten sich die motorischen Einschränkungen bis 24h (Md 4,25). Im weiteren Verlauf kam es, wie in der Placebogruppe, zu einer erneuten Verschlechterung der motorischen Funktion (Zeitpunkt 96h: Md 3,50).

Die klinische Verschlechterung zum Endzeitpunkt 96h war, verglichen mit dem jeweiligen postoperativen Tarlov Höchstmedianwert, lediglich in der cEPO-FC 15min Gruppe signifikant (Md Kontrolle 15min: 4,25 (6h) vs. 3,63 (96h); p= 0,5288 / Md cEPO-FC 15min: 4,25 (24h) vs. 3,50 (96h); p= 0,0355). Während der gesamten klinischen Nachbeobachtung zeichnete sich zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied ab. Die cEPO-Studiengruppe konnte gegenüber der Kontrollgruppe statistisch keine klinische Verbesserung erzielen (siehe Abbildung 10). Beide Gruppen zeigten nach postoperativer Paraplegie eine frühe neurologische Erholung. Der postoperative Verlauf war in beiden Gruppen nahezu identisch. Nach initialer Verbesserung des klinischen Outcomes wurde eine erneute Verschlechterung registriert.

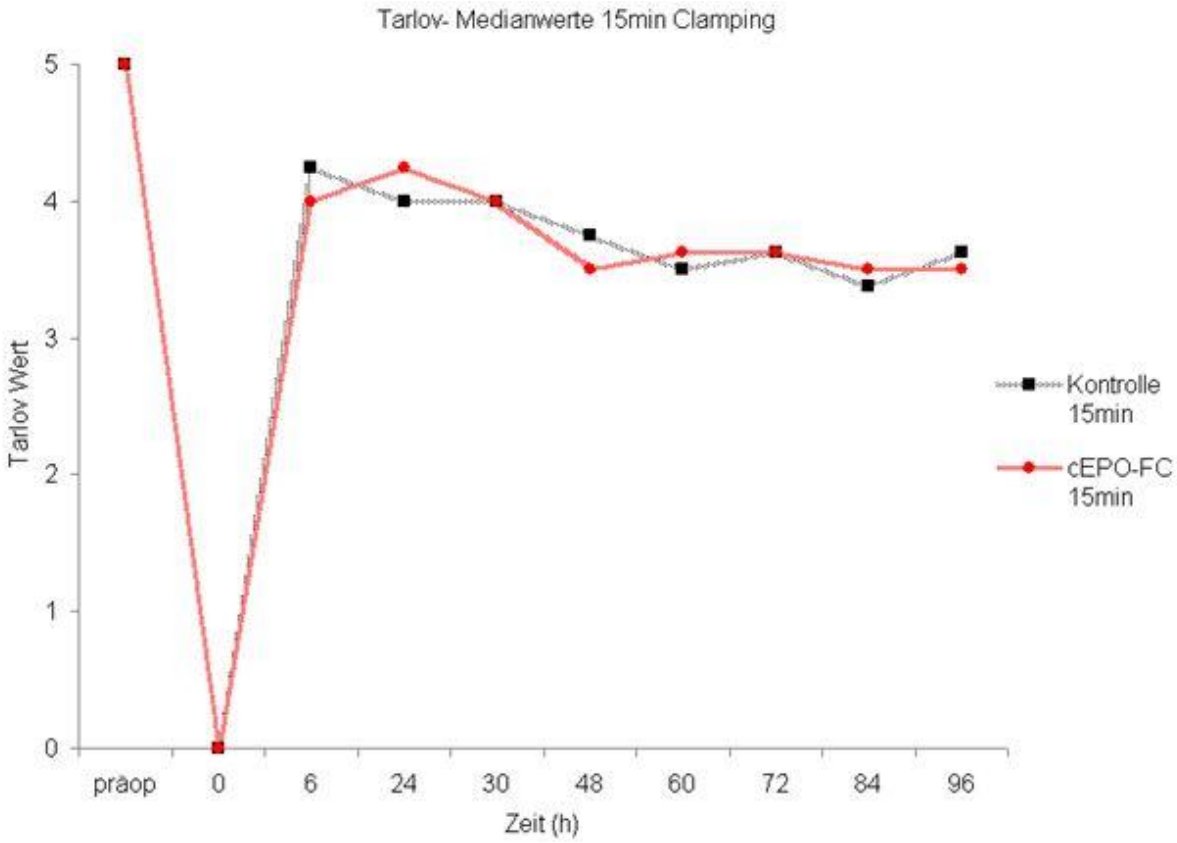

Abbildung 10: Tarlov Medianwerte der ersten Versuchsreihe (15min Clampingzeit)
Unmittelbar nach Beendigung der Operation wurde bei weitestgehend allen Tieren eine komplette Plegie der Hinterläufe beobachtet. Im Verlauf kam es bei beiden Gruppen zum Zeitpunkt 6h zu einer höchst signifikanten Verbesserung der motorischen Funktion. Bis zum vierten postoperativen Tag verschlechterte sich abermals in beiden Gruppen die motorische Funktion der Hinterläufe. Dieser Abfall verglichen mit dem jeweiligen postoperativen Höchstniveau, war lediglich in der cEPO-FC 15min Gruppe statistisch signifikant.

3.1.2 Histologische Auswertung

Bei beiden Gruppen erfolgte am vierten postoperativen Tag die Entnahme des Rückenmarks zur histologischen Auswertung. Bei allen Tieren konnte das Rückenmark unversehrt gewonnen werden.

Von jedem Tier wurden thorakale, thorakolumbale und drei lumbale Rückenmarksproben in oben beschriebener Methodik entnommen und histologisch verarbeitet. Aufgrund der Klemmlokalisation war lediglich in den Lumbalbereichen

mit einer histologischen Schädigung zu rechnen. Die thorakalen und thorakolumbalen Präparate dienten als Kontrollsegmente.

In der ersten Versuchsdurchführung konnten insgesamt 20 Tiere histologisch ausgewertet werden.

Bei allen Tieren fand sich im Bereich der thorakalen und thorakolumbalen Kontrollsegmente kein Anhalt für eine ischämische Schädigung (Histologie Score 5). Im Gegensatz dazu manifestierte sich in allen Lumbalsegmenten ein ischämischer Schaden unterschiedlichen Ausmaßes.

Auch auf histologischer Ebene konnte durch die Applikation von carbamyliertem Erythropoietin keine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden (siehe Abbildung 11).

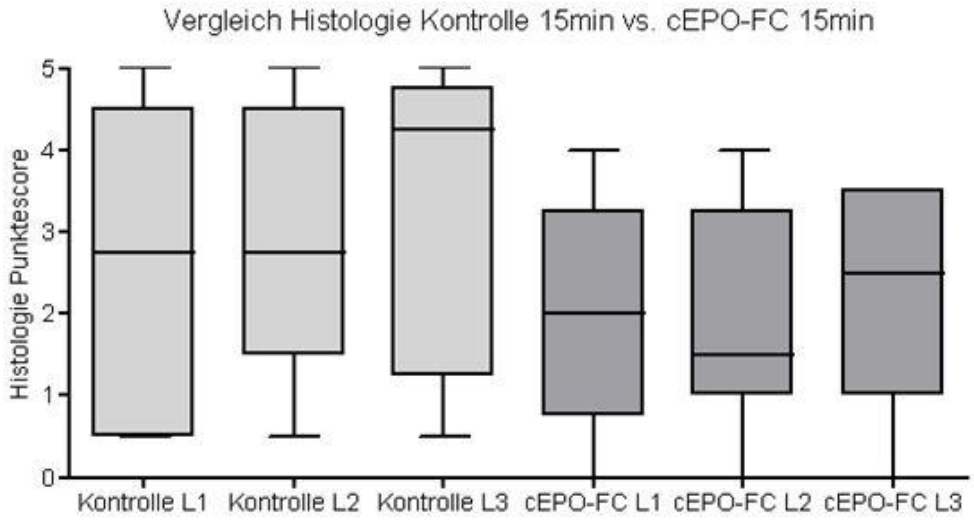

Abbildung 11: Histologische Auswertung der Lumbalsegmente (L1-L3) der ersten Versuchsdurchführung

In der statistischen Auswertung konnten weder innerhalb noch zwischen beiden Gruppen signifikante Unterschiede berechnet werden (Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparison test).

Kontrolle 15min Md: 2,75 (L1), 2,75 (L2), 4,25 (L3)

cEPO-FC 15min Md: 2,00 (L1), 1,50 (L2), 2,50 (L3)

Zur Validierung der Methodik erfolgte die Überprüfung einer Korrelation zwischen klinischem und histologischem Outcome. Die Berechnung wurde mit dem Spearman Korrelationstest durchgeführt. Repräsentativ werden die Tarlov Werte der 48h und 96h Zeitpunkte aufgeführt.

Im Vergleich aller 48h Tarlov Werte mit den histologischen Mittelwerten der Lumbalsegmente L1-L3 konnte eine signifikante Korrelation berechnet werden (siehe Abbildung 12). Eine Korrelation der histologischen Ergebnisse zeigte sich ebenfalls für Tarlov Werte des 96h Zeitpunktes (siehe Abbildung 13).

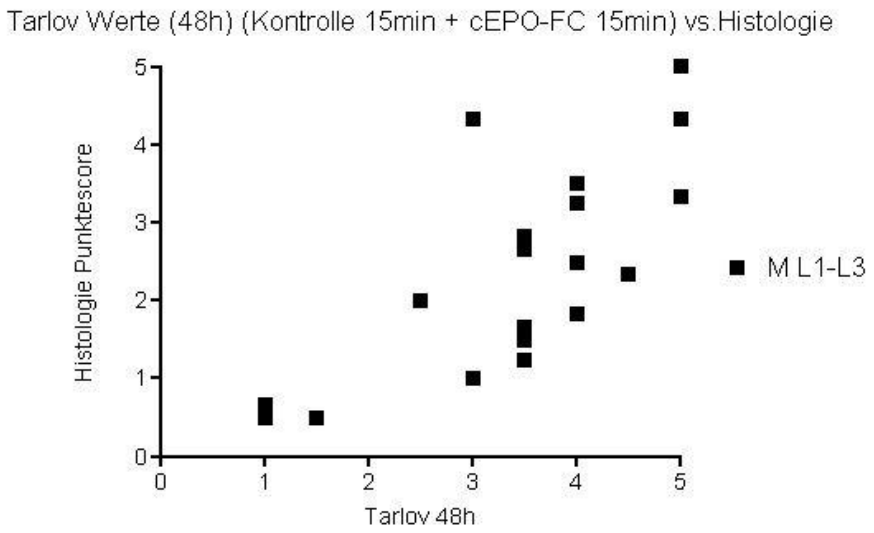

Abbildung 12: Korrelation klinischer (48h) und histologischer Ergebnisse der ersten Versuchsdurchführung

M 48h Tarlov (gesamt)= 3,50, M L1-L3= 2,42; p= 0,002 (L= Lumbalsegmente)

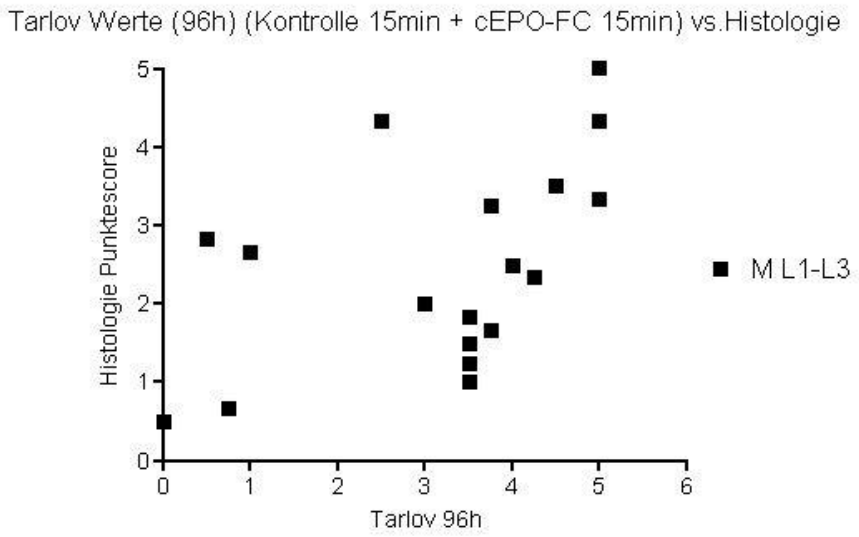

Abbildung 13: Korrelation klinischer (96h) und histologischer Ergebnisse der ersten Versuchsdurchführung

M 96h Tarlov (gesamt)= 3,10, M L1-L3= 2,42; p=0,0015 (L= Lumbalsegmente)

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der cEPO-FC Studiengruppe konnte auch in der histologischen Auswertung der Lumbalsegmente nicht gefunden werden.

Eine perioperative Applikation von carbamyliertem Erythropoietin vor und nach Ausklemmung der infrarenalen Aorta über 15min konnte weder das klinische noch das histologische Outcome gegenüber der Kontrollgruppe verbessern.

Die klinischen Ergebnisse korrelierten mit den histologischen Ergebnissen.

3.2 Reevaluation des Klemmzeitintervalls

3.2.1 Klinische Auswertung

In der Literatur findet sich eine große Varianz der Clampingzeit zur Induktion einer spinalen Ischämie beim Kaninchen [12, 69, 84, 90, 94, 113]. Des Weiteren ist eine große Diskrepanz des neurologischen Outcomes nach aortalem Crossclamping für diese Spezies bekannt [166].

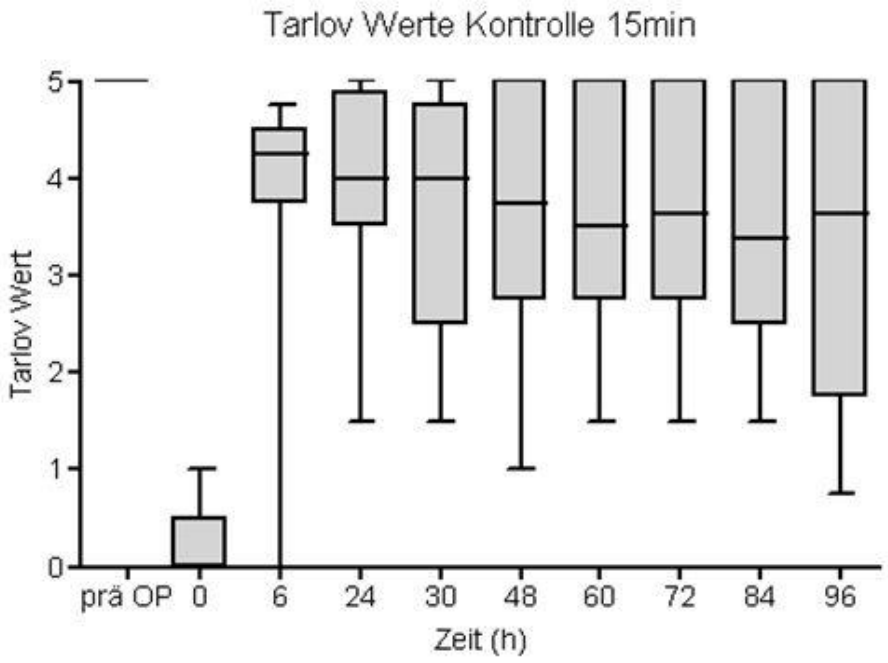

Abbildung 14: Tarlov Werte der Kontrollgruppe 15min im postoperativen Verlauf (n= 10)

Erste Versuche zur Untersuchung von carbamyliertem Erythropoietin (cEPO-FC) führten wir mit einer Klemmzeit von 15min durch. Die Box Plot Graphik in Abbildung 14 zeigt die Tarlov Scores der Kontrollgruppe 15min im postoperativen Verlauf.

Nach postoperativer Lähmung der Hinterläufe (Tarlov Md 0,00) war eine statistisch signifikante Verbesserung der Klinik zu beobachten. Nach 6h wurde ein Medianwert von 4,25 erreicht. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich abermals die motorische Funktion.

Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich, setzten sich die Tarlov Medianwerte der Kontrollgruppe ab dem 24h Messzeitpunkt aus einer großen Streubreite von Einzelwerten zusammen.

Nach statistischer Auswertung musste rückblickend von einer inhomogenen Kontrollgruppe ausgegangen werden. Das klinische Outcome zeigte nach einer aortalen Klemmzeit von 15min eine große Varianz.

Zudem näherten sich die Medianwerte im postoperativen Verlauf zu stark an den physiologischen Ausgangswert (Tarlov Wert 5).

Ein potentiell wirksames Studienmedikament hätte in diesem Fall wenig Spielraum für signifikante Verbesserungen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit die Klemmzeit in separaten Versuchen nachträglich zu bestimmen.

Zur Reevaluation der optimalen Clampingzeit führten wir weitere Versuche mit den in Tabelle 7 beschriebenen Klemmzeiten durch:

Tabelle 7: Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Klemmzeit beim Kaninchen

Kontrollgruppe 17min Placebo (5 Tiere, n= 4 überlebend)
Kontrollgruppe 20min Placebo (13 Tiere, n= 11 überlebend)
Kontrollgruppe 22min Placebo (15 Tiere, n= 10 überlebend)
Kontrollgruppe 25min Placebo (1 Tier, n= 1 überlebend)
Kontrollgruppe 30min Placebo (2 Tiere, n= 2 überlebend)
Σ 36 Tiere (n= 28 überlebend)

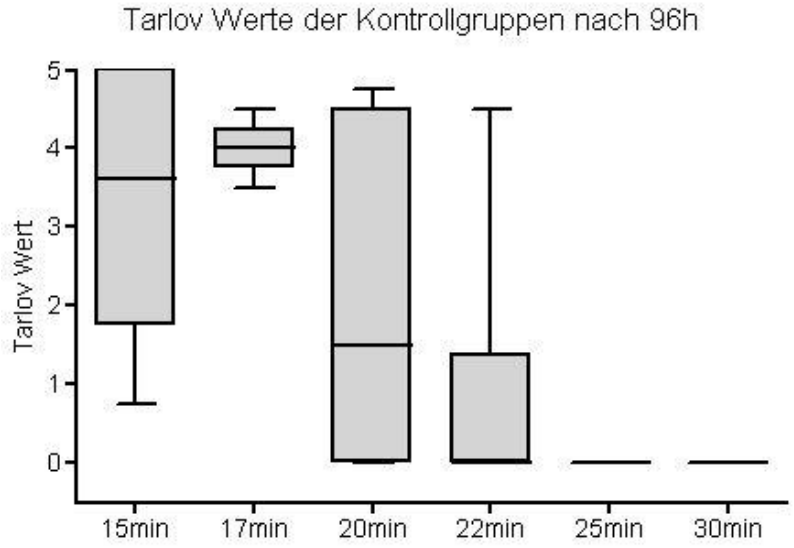

Abbildung 15: Tarlov Werte aller Kontrollgruppen zum Zeitpunkt 96h nach Aortenclamping

Dargestellt sind die klinischen Verlaufskontrollen zum Endzeitpunkt 96h aller Kontrollgruppen. Mit verlängerter Klemmzeit der infrarenalen Aorta (x-Achse: 15-30min) kam es zu einer zunehmenden Lähmung der Hinterläufe (y-Achse: Tarlov Werte). Bei einer Klemmzeit von 22min wurde zum Zeitpunkt 96h erstmals eine homogene Paraplegie mit geringer Streubreite beobachtet. Mit zunehmender Klemmzeit über 22min zeigten alle Tiere eine (irreversible) Querschnittslähmung.

In einer Kontrollgruppe mit einer aortalen Klemmzeit von 17min wurden 5 Tiere operiert und nachuntersucht. Bei insgesamt 4 überlebenden Tieren konnte ein ähnliches klinisches Outcome beobachtet werden wie in der Kontrollgruppe mit 15min Ischämiezeit. Die Clampingzeit wurde dementsprechend auf 20min verlängert (n= 11). Der Tarlov Medianwert verschlechterte sich hier erstmals in der 96h Auswertung. Er setzte sich jedoch erneut aus einer großen Streubreite einzelner Tarlov Werte zusammen (siehe Abbildung 15). Das klinische Outcome der Tiere variierte auch bei einer aortalen Klemmzeit von 20min deutlich.

Erst ab einer Klemmzeit von 22min (n= 10) konnte ein homogenes klinisches Outcome erzielt werden (siehe Abbildung 15).

Wir gingen nach dieser Beobachtung davon aus, dass sich im Kaninchenmodell ab einer aortalen Klemmzeit von 22min eine klinisch relevante Rückenmarksischämie einheitlich manifestiert.

Würde die Klemmzeit länger als 22min betragen, so muss von einer zunehmenden spinalen Schädigung ausgegangen werden. Eine medikamentöse Prophylaxe wäre mit zunehmender Ischämiezeit uneffektiv.

Bei einer Klemmzeit von 25min (n=1) und 30min (n=2) wurde während der gesamten klinischen Nachbeobachtung eine komplette Plegie der Hinterläufe beobachtet (Tarlov Wert 0).

Abbildung 16 zeigt die Tarlov Medianwerte der Kontrollgruppe 22min im postoperativen Verlauf. Vor der Operation zeigten alle Tiere einen physiologischen Ausgangswert (Tarlov Wert 5). Nach Abklingen der Narkose wurde bei allen Tieren eine komplette Plegie der Hinterläufe beobachtet. Wie in der ersten Versuchsdurchführung verbesserte sich die neurologische Funktion in der frühen Phase der Nachbeobachtungszeit, um sich dann abermals zu verschlechtern.

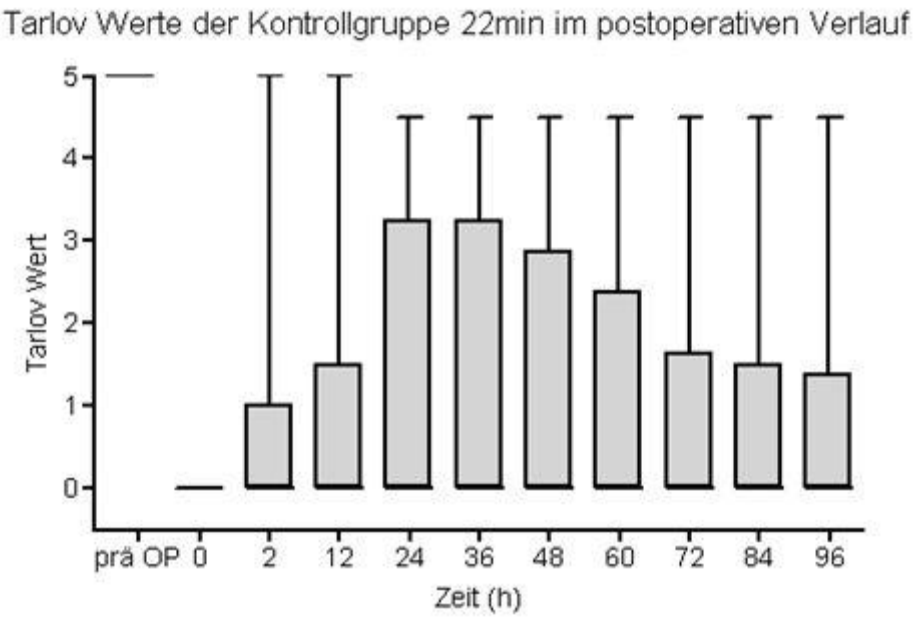

Abbildung 16: Tarlov Werte der Kontrollgruppe 22min im postoperativen Beobachtungszeitraum

Wie der Box Plot Graphik in Abbildung 16 zu entnehmen ist, wäre nach einer aortalen Klemmzeit von 22min ausreichend Spielraum, um klinisch signifikante Verbesserungen nach pharmakologischer Konditionierung zu registrieren.

Mit zunehmender Klemmzeitdauer und Plegie der Hinterläufe traten Miktionslähmungen der Tiere auf. Während den klinischen Kontrolluntersuchungen wurde bei

allen Tieren auf eine Überlaufblase geachtet und bei Bedarf das Credé Manöver zur Miktionsunterstützung angewandt. Eine Entleerung der Blase war dadurch möglich.

In der 17min Kontrollgruppe wurden erstmals nach Beendigung der Operation generalisierte Krampfanfälle (Streckkrämpfe) beobachtet. Zwei Tiere der 17min Kontrollgruppe waren von rezidivierenden Anfällen betroffen. Ein Tier verstarb im therapierefraktären Krampfanfall nach 30h Nachbeobachtung. Eine erkennbare Ursache der neurologischen Symptomatik konnte mit den Tierärzten des Tierforschungszentrums nicht gefunden werden. Ein systematischer Fehler konnte nach ausführlicher Überprüfung ausgeschlossen werden.

Auftretende Krampfanfälle ließen sich fortan mittels Midazolam (0,25mg/kg KG) therapieren. Nach Abschluss der 17min Kontrollversuche führten wir eine pharmakologische Krampfprophylaxe ein. Nach Abklingen der Narkosewirkung verabreichten wir allen Tieren eine einmalige Gabe von Midazolam (0,25mg/kg KG iv.). Eine neurologische Krampfsymptomatik konnte dadurch erfolgreich therapiert beziehungsweise verhindert werden. Alle Tiere der zweiten Versuchsdurchführung hatten eine Prophylaxe mit Midazolam erhalten.

Mit Hilfe der Versuche zur Reevaluation der Clampingzeit war es gelungen, ein optimales Klemmzeitintervall für nachfolgende Versuche zu identifizieren. Klemmphasen unter 22min führten zu einem inhomogenen klinischem Outcome der Kontrollgruppen. Wurde die Klemmphase länger als 22min gewählt, so musste mit einer irreversiblen Ischämie des Rückenmarks gerechnet werden.

3.2.2 Histologische Auswertung

Auch bei den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Klemmzeit erfolgte am vierten postoperativen Tag die Entnahme des Rückenmarks zur histologischen Beurteilung. Wie in der ersten Versuchsdurchführung konnten in den thorakalen und thorakolumbalen Kontrollsegmenten keine ischämischen Schädigungen gefunden werden (Histologie Score 5). Erneut war die spinale Ischämie in unterschiedlicher Ausprägung auf die Lumbalsegmente (L1-L3) begrenzt.

Abbildung 17 verdeutlicht die statistische Auswertung der Lumbalsegmente der Kontrollgruppen 15min, 17min, 20min und 22min. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe 15min wurden zum Vergleich mit abgebildet.
Ähnlich zum klinischen Verlauf der Kontrollgruppe 15min setzten sich die Medianwerte der histologischen Auswertung aus einer großen Streubreite zusammen. Erst mit zunehmender Dauer der aortalen Klemmzeit erreichten die Medianwerte einheitlich schlechtere Werte. Auch auf histologischer Ebene kam es ab einer Klemmzeit von 22min zu einer erkennbaren Reduktion der statistischen Streubreite (siehe Abbildung 17).

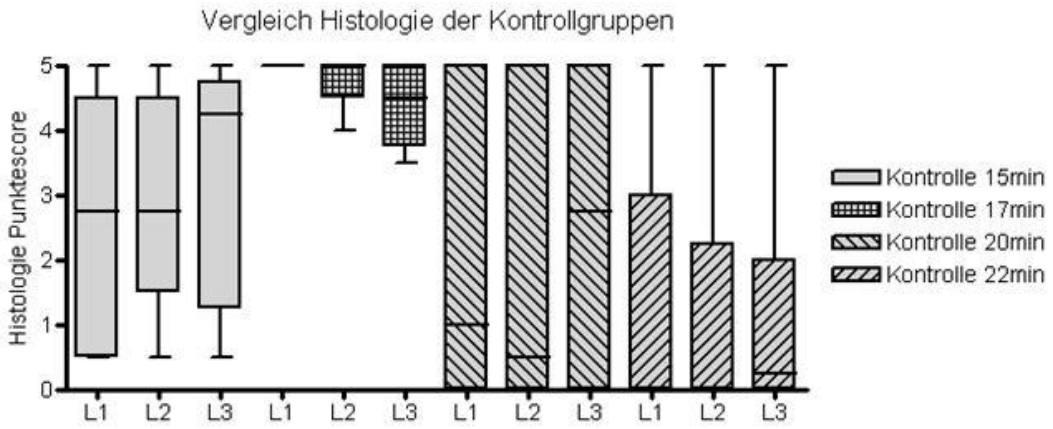

Abbildung 17: Histologische Auswertung aller Kontrollgruppen

Dargestellt ist der Grad der histologischen Schädigung (y-Achse) aller Kontrollgruppen abhängig von der jeweiligen aortalen Klemmzeit (siehe Legende). Eine Klemmzeit von 22min führte im Bereich aller Rückenmarkssegmente (L1, L2, L3) zu einer einheitlichen spinalen Schädigung.
Kontrolle 15min Md: 2,75 (L1), 2,75 (L2), 4,25 (L3)
Kontrolle 17min Md: 5,00 (L1), 5,00 (L2), 4,50 (L3)
Kontrolle 20min Md: 1,00 (L1), 0,50 (L2), 2,75 (L3)
Kontrolle 22min Md: 0,00 (L1), 0,00 (L2), 0,25 (L3)

Eine aortale Ausklemmung von 22min zeigte auch in der histologischen Auswertung weitestgehend homogene Ergebnisse. Ein potentiell wirksames Studienmedikament hätte auch auf histologischer Ebene ausreichend Spielraum für signifikante Verbesserungen.

3.3 Zweite Versuchsdurchführung 22min Clamping

3.3.1 Klinische Auswertung

In der ersten Versuchsdurchführung konnte die cEPO-FC Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe 15min bei einer Klemmzeit von 15min keine signifikante Verbesserung hinsichtlich Klinik und Histologie erzielen. Nach Reevaluation und Optimierung der Ausklemmzeit auf 22min folgte eine zweite Versuchsdurchführung zur Testung von cEPO-FC und nativem Erythropoietin (EPO). Die Kontrollgruppe 22min (n=10) bestand bereits aus den Vorversuchen zur Ermittlung der optimalen Clampingzeit.

Die Methodik des ersten Versuchsablaufs wurde übernommen, mit Ausnahme der längeren Klemmzeit, einer postoperativen Midazolamgabe zur Krampfprophylaxe und zusätzlicher klinischer Nachbeobachtungszeitpunkte. Klinische Kontrollen zur Beurteilung der motorischen Funktion erfolgten in der zweiten Versuchsdurchführung nach 2h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, und 96h.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über den zweiten Versuchsablauf:

Tabelle 8: Zweiter Versuchsablauf (22min Clampingdauer)

Vergleich einer EPO Studiengruppe mit einer cEPO-FC Studiengruppe.

Studiengruppe 22min cEPO-FC (9 Tiere, n= 7 überlebend)
Studiengruppe 22min EPO (10 Tiere, n= 10 überlebend)
Σ 19 Tiere (n= 17 überlebend)

In der Kontrollgruppe 22min waren 5 Tiere von 15 während der Nachbeobachtungszeit verstorben. In der cEPO-FC 22min Studiengruppe waren 2 von 9 Tieren betroffen. Eine erklärbare Ursache konnte, wie in den vorherigen Versuchsreihen, durch Hinzuziehen der Tierärzte vom Tierforschungszentrum nicht gefunden

werden. Postoperative Streckkrämpfe waren nach Einführung der postoperativen Midazolamgabe rückläufig. Aufgetretene Krampfanfälle konnten erfolgreich durch eine Midazolam Applikation (0,5mg/kg KG) durchbrochen werden.

Nachfolgende Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse der zweiten Versuchsdurchführung:

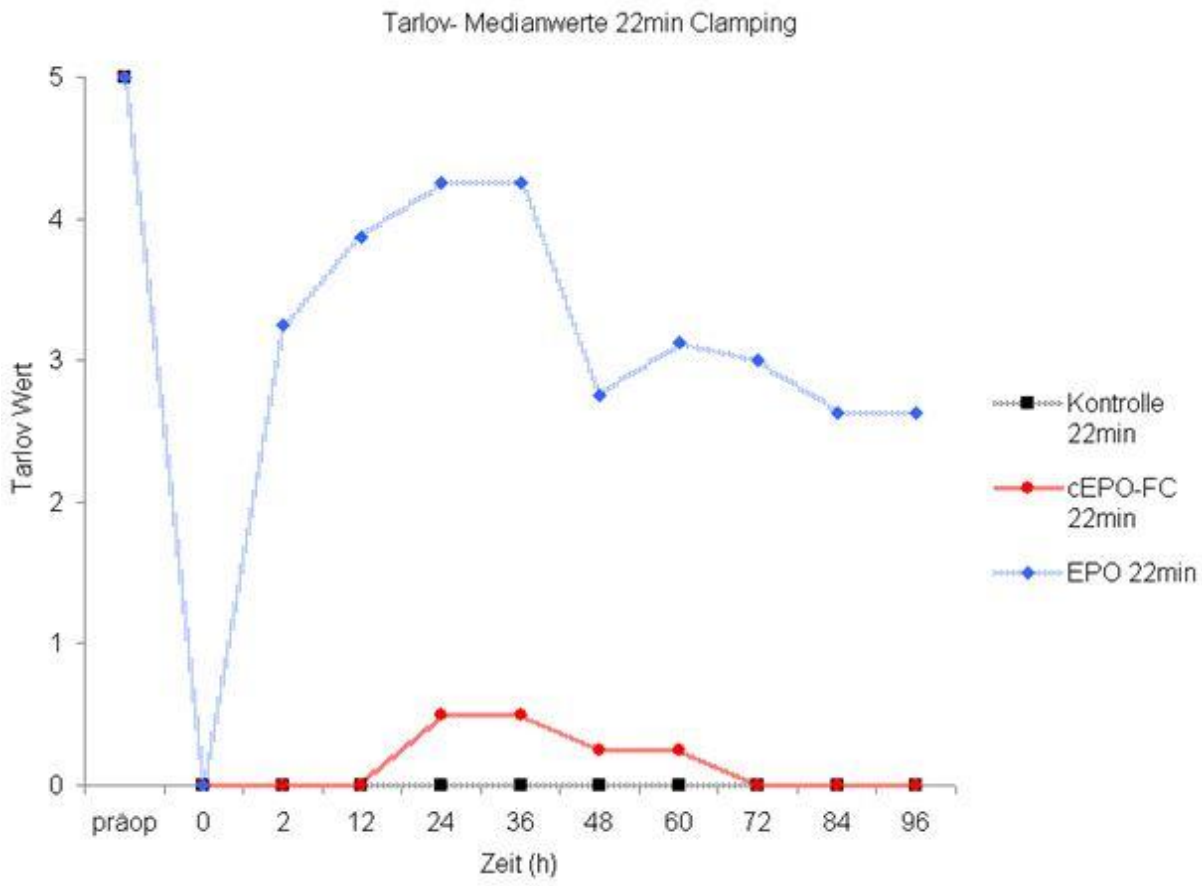

Abbildung 18: Tarlov Medianwerte der zweiten Versuchsdurchführung im postoperativen Verlauf

Unmittelbar nach Beendigung der Operation zeigten alle Gruppen eine Plegie der Hinterläufe. In der frühen Phase der Nachbeobachtungszeit (bis 36h) zeigte die EPO Gruppe gegenüber den beiden anderen Versuchsgruppen eine statistisch signifikante Regeneration der spinalen Funktion. Die cEPO-FC Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe 22min erneut keine Verbesserung des klinischen Outcomes erreichen. Beide Gruppen zeigten im postoperativen Verlauf ähnliche Verläufe. Lediglich die EPO 22min Gruppe zeigte eine statistisch signifikante Verbesserung des klinischen Outcomes nach initialer Paraplegie. Die klinische Verschlechterung der jeweiligen Tarlovhöchstwerte verglichen mit dem jeweiligen Ergebnis der 96h Untersuchung war in keiner Versuchsgruppe statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test & Dunn’s comparison method).

Identisch zum Vorversuch der Kontrollgruppe 22min wurde in beiden Studiengruppen unmittelbar nach Beendigung der Operation eine komplette Lähmung der Hinterläufe beobachtet (Tarlov Wert 0), mit Ausnahme eines Tieres der EPO 22min Gruppe (Tarlov Wert 4). In der klinischen Untersuchung nach 2h kam es zwischen den Studiengruppen zu einer divergenten Entwicklung. Während die cEPO-FC 22min Studiengruppe ähnlich der Kontrollgruppe 22min eine persistierende Einschränkung der motorischen Funktion zeigte, verbesserte sich in der EPO 22min Gruppe die neurologische Schädigung signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe 22min (Zeitpunkt 2h: Md EPO 22min 3,25 vs. Md Kontrolle 22min 0,00; p= 0,0089). In den weiteren klinischen Verlaufskontrollen kam es zu einer weiteren Verbesserung der postoperativen Paraplegie. In der 12h Kontrolluntersuchung zeigte die EPO 22min Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe 22min eine fortbestehende signifikante Verbesserung der gemessenen Tarlov Werte (Zeitpunkt 12h: Md EPO 22min 3,88 vs. Md Kontrolle 22min 0,00; p= 0,0015). Die statistische Signifikanz hielt bis zu den Beobachtungszeitpunkten 24h und 36h an (Zeitpunkt 24h: Md EPO 22min 4,25 vs. Md Kontrolle 22min 0,00; p= 0,0089 / Zeitpunkt 36h: Md EPO 22min 3,18 vs. Md Kontrolle 22min 1,10; p= 0,0232). Im weiteren Verlauf verschlechterte sich die neurologische Funktion der EPO 22min Gruppe. Graphisch zeigt die EPO Studiengruppe während der gesamten postoperativen Nachbeobachtungszeit das beste klinische Outcome (siehe Abbildung 18). Eine statistisch signifikante Überlegenheit der EPO 22min Gruppe konnte ab dem Zeitpunkt 36h statistisch nicht mehr belegt werden. Durch die Gabe von nativem Erythropoietin konnte insbesondere in der frühen Phase eine Verbesserung der motorischen Funktion erreicht werden.

Wie im ersten Testversuch konnte durch die Gabe von cEPO-FC keine klinische Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden. Die postoperativen Median - und Mittelwerte der klinischen Nachbeobachtung unterschieden sich nicht wesentlich von denen der Kontrollgruppe.

Auch im direkten Vergleich der beiden Studiengruppen konnte eine signifikante Verbesserung der EPO Gruppe in der frühen Nachbeobachtungsphase registriert werden.

Eine Wirksamkeit des carbamylierten EPO Derivates zur Prophylaxe einer postoperativen Rückenmarksischämie konnte auch in der zweiten Versuchsdurchführung nicht bestätigt werden.
Mit Ausnahme eines Tieres, zeigten alle Tiere der EPO 22min Gruppe eine postoperative Paraplegie. Die klinische Regeneration wurde durch die pharmakologische Konditionierung günstig beeinflusst. Dieser Effekt war insbesondere in den ersten 36h nach aortalem Crossclamping feststellbar. Der statistische Vergleich des 0h Tarlov Wertes mit dem Tarlov Wert des Endzeitpunktes (96h) belegt eine protektive Wirksamkeit des nativen Erythropoietins (Md 0,00 (0h) vs. Md 2,63 (96h); p= 0,0433; Mann Whitney Test).

3.3.2 Histologische Auswertung

Wie in der ersten Versuchsdurchführung erfolgte nach 96h klinischer Nachbeobachtungszeit die Gewebeentnahme zur histologischen Aufarbeitung. Erneut konnte bei allen Tieren das Rückenmark unversehrt entnommen werden. Die Entnahmedauer unterschied sich nicht von den vorherigen Versuchen.
Die histologische Auswertung erfolgte mittels des bereits erläuterten 5-Punktescores in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsklinik Ulm.
Bei jedem Tier wurden ein thorakales -, ein thorakolumbales - (Kontrollsegmente) und drei lumbale Rückenmarksegmente entnommen. In der zweiten Versuchsdurchführung konnten 17 Tiere histologisch ausgewertet werden.
Sowohl für die Tiere der Studiengruppen (cEPO-FC und EPO), als auch für die Tiere der Kontrollgruppe 22min konnte im Bereich der thorakalen und thorakolumbalen Rückenmarkssegmente kein Hinweis auf eine ischämische Schädigung gefunden werden. Alle Kontrollsegmente der zweiten Versuchsdurchführung wurden dementsprechend mit 5 klassifiziert. In den lumbalen Abschnitten zeigte sich, wie in den vorherigen Versuchen, ein unterschiedliches Ausmaß einer ischämischen Schädigung.
In der statistischen Auswertung der einzelnen Lumbalsegmente konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt werden

(Kruskal-Wallis Test). Tendenziell zeigte die cEPO-FC Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie in der ersten Versuchsdurchführung, ein schlechteres histologisches Outcome (siehe Abbildung 19). Die EPO Gruppe zeigte histologisch eine große statistische Varianz. Eine statistische Überlegenheit konnte nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 19).

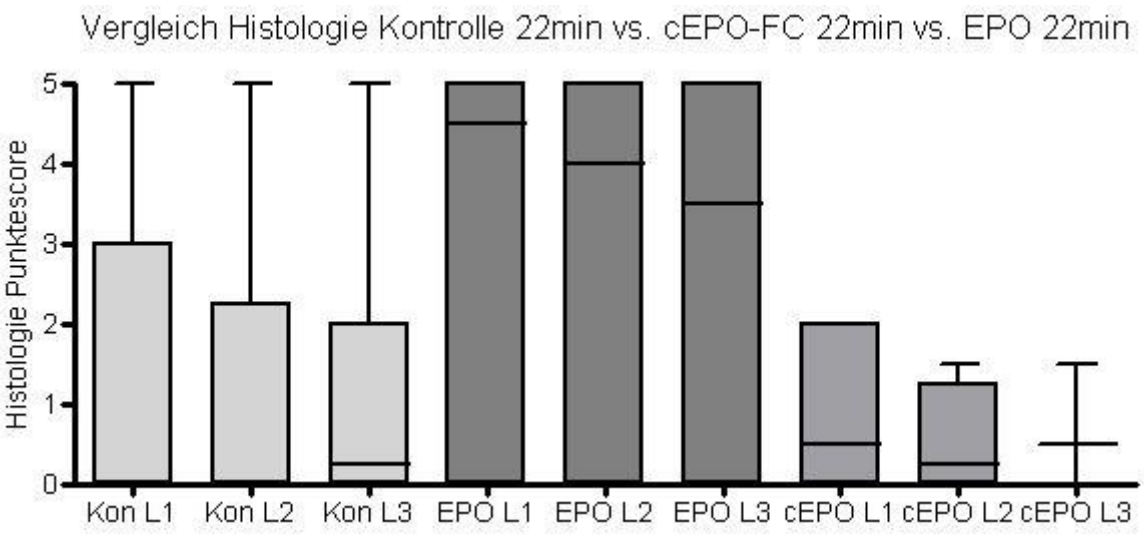

Abbildung 19: Histologische Auswertung der zweiten Versuchsdurchführung

In der histologischen Auswertung (Lumbalsegmente L1-L3) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen errechnet werden (Kruskal-Wallis Test und Dunn's multiple comparison method). Graphisch zeigt die cEPO-FC (cEPO) Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kon) ein tendenziell schlechteres histologisches Outcome. Durch Konditionierung mit nativem Erythropoietin (EPO) lässt sich trotz großer statistischer Streubreite zumindest graphisch ein verbessertes histologisches Outcome erkennen.

Kontrolle 22min Md: 0,00 (L1), 0,00 (L2), 0,25 (L3)

cEPO-FC 22min Md: 0,50 (L1), 0,25 (L2), 0,50 (L3)

EPO 22min Md: 4,50 (L1), 4,00 (L2), 3,50 (L3)

(Kon= Kontrolle)

Die statistische Auswertung des ersten Versuchsablaufs zeigte eine deutliche Korrelation zwischen klinischen und histologischen Ergebnissen. Auch in der zweiten Versuchsdurchführung konnte dies statistisch belegt werden (Spearman Korrelationstest).

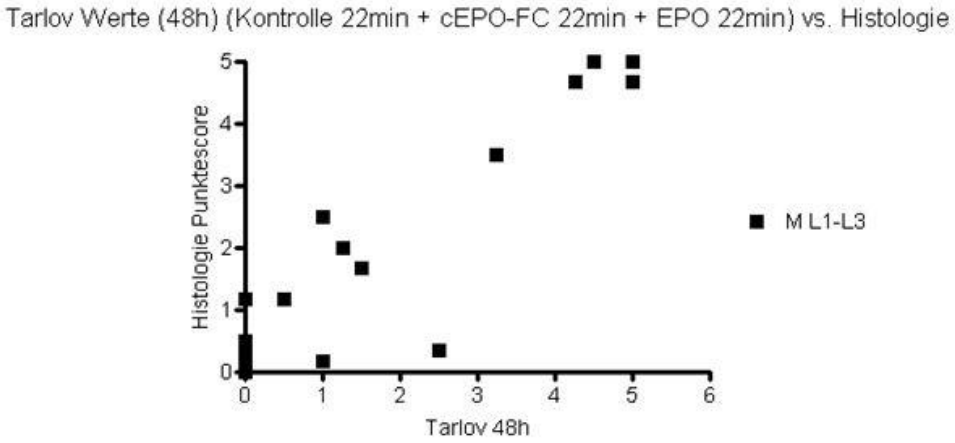

Abbildung 20: Korrelation klinischer (48h) und histologischer Ergebnisse der zweiten Versuchsdurchführung

M 48h Tarlov (gesamt)= 1,47, M L1-L3= 1,62; p<0,0001 (L= Lumbalsegmente)

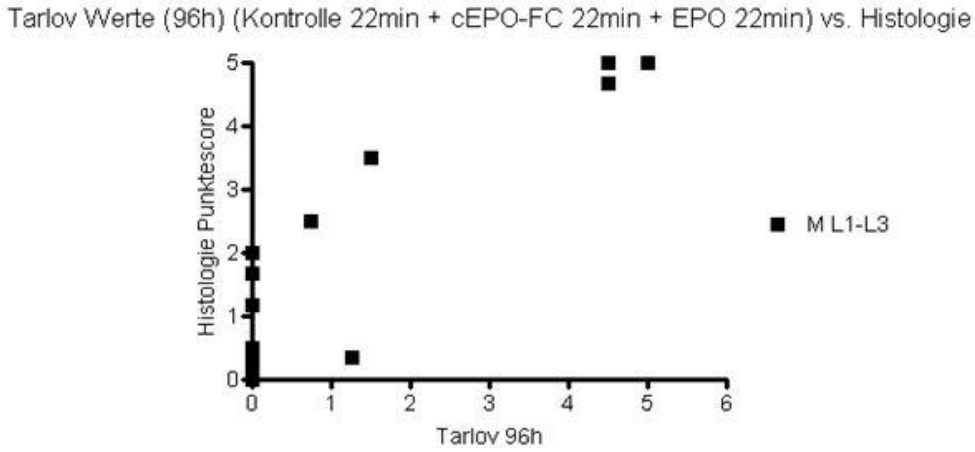

Abbildung 21: Korrelation klinischer (96h) und histologischer Ergebnisse der zweiten Versuchsdurchführung

M 96h Tarlov (gesamt)= 1,17, M L1-L3= 1,62; p< 0,0001 (L= Lumbalsegmente)

Eine Konditionierung mit nativem Erythropoietin führte zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Outcomes. Statistisch konnte dies für die Histologie aufgrund der großen statistischen Streubreite nicht bestätigt werden. Die Kontrollgruppe 22min und die cEPO-FC 22min Studiengruppe zeigten sowohl histologisch als auch klinisch ein homogen schlechtes Outcome.

Eine deutliche Korrelation zwischen klinischen und histologischen Ergebnissen konnte erneut bestätigt werden.

3.4 Beurteilung der histologischen Färbemethoden

Am vierten postoperativen Tag wurde nach Entnahme des Rückenmarks die histologische Aufarbeitung durchgeführt. Es wurden Hämatoxylin-Eosin -, van Gieson Elastica -, Nissl -, Masson Goldner - und Eisenfärbungen angefertigt. Für die histologische Auswertung diente der Ischämiepunktescore der Hämatoxylin & Eosin Färbung.

Weiterführende Ergebnisse konnten weder mit der van Gieson Elastica noch mit der Masson Goldner Färbung gewonnen werden (siehe Abbildungen 22 und 23). Infarkte, alpha Motoneurone und Entzündungszellinfiltrate kamen am deutlichsten in der H&E Färbung zur Darstellung.

Mit Hilfe der Eisenfärbung lässt sich Hämosiderin in Makrophagen (Siderophagen) nachweisen. In keinem unserer Präparate konnten mit Hilfe der Eisenfärbung Hinweise auf Einblutungen oder hämorrhagische Infarktkomponenten gefunden werden (siehe Abbildung 24). Die Nissl Färbung erbrachte im Vergleich zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine weiterführende Ergebnisse. Vitale Motoneurone der grauen Substanz konnten in beiden Färbemethoden gleichermaßen dargestellt werden (siehe Abbildung 25). In der Nissl Färbung kamen die eingangs erwähnten Tigroid Schollen im Zytoplasma der Motoneurone eindrucksvoll zur Darstellung (siehe Abbildung 26). Alle in der H&E Färbung sichtbaren alpha Motoneurone zeigten in der Nissl Färbung Tigroid Schollen, ein Charakteristikum für vitale neuronale Zellen. Tigrolysen der Motoneurone wurden nicht detektiert. Nach einer viertägigen Beobachtungszeit kamen histologisch ausgereifte Infarktareale oder vitale Motoneurone zur Darstellung. Zwischenstufen der Zelldegeneration (Tigrolyse) waren nicht sichtbar.

Tendenziell waren zentral gelegene alpha Motoneurone am stärksten von einer ischämischen Schädigung betroffen. Dies konnte insbesondere im Stadium 1 und 2 des histologischen Ischämiescores beobachtet werden. In der grauen Substanz

außen lokalisierte Ganglienzellen blieben unter ausgeprägter Ischämie tendenziell am längsten erhalten (siehe Abbildung 27). Die weiße Rückenmarkssubstanz war in allen Präparaten intakt und von keiner ischämischen Schädigung betroffen. Dies konnte in allen angewandten Färbemethoden bestätigt werden.

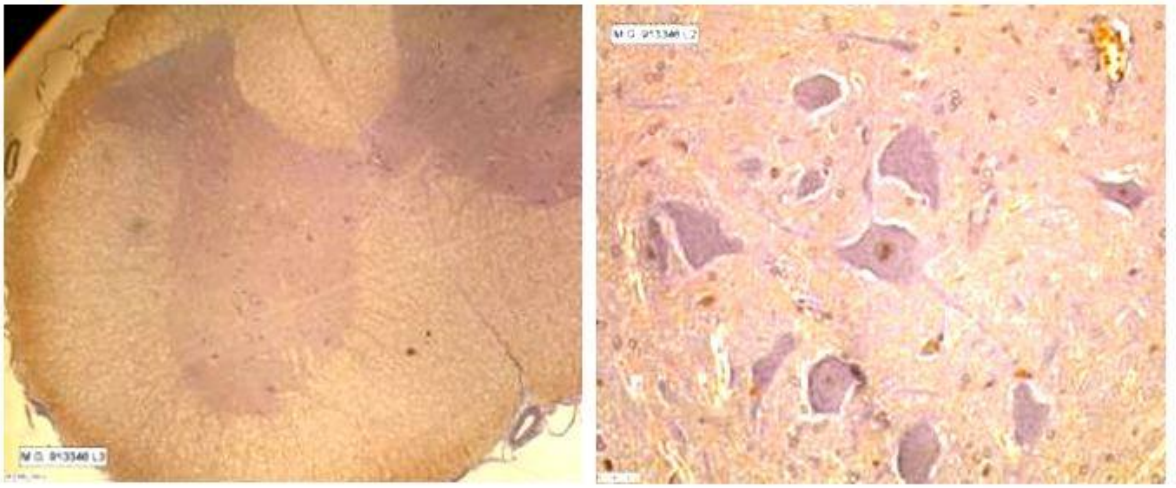

Abbildung 22: Mason Goldner Färbung des lumbalen Rückenmarks beim Kaninchen
Mit dieser Färbemethode ließen sich gleichermaßen wie in der H&E Färbung histomorphologische Aussagen über den Grad der ischämischen Schädigung treffen. Beide Abbildungen zeigen ein lumbales Rückenmarkssegment ohne Hinweis auf ischämische Pathologien. Das rechte Bild zeigt eine Gruppierung vitaler alpha Motoneurone. (Vergrößerung Bild links 40fach, Vergrößerung Bild rechts 400fach)

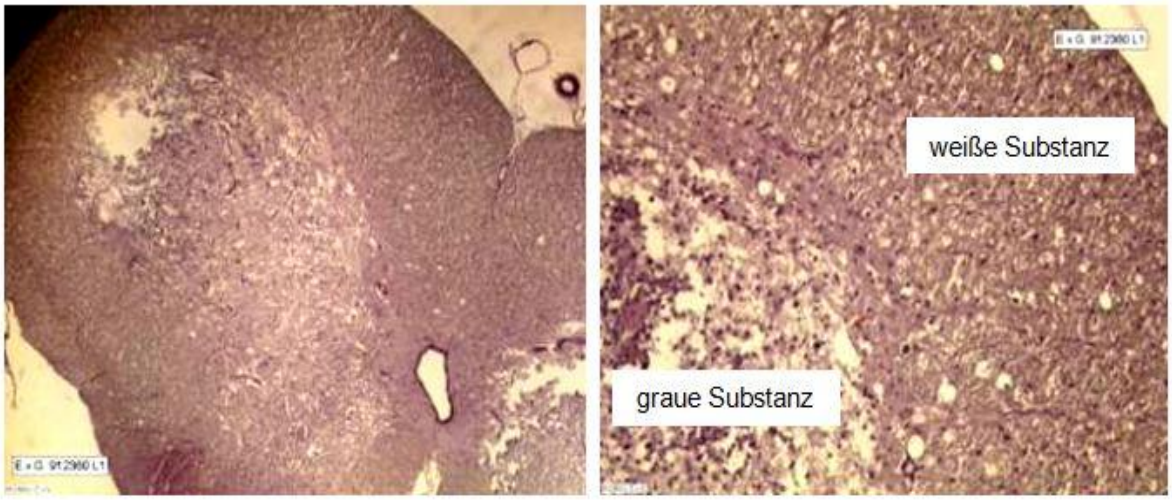

Abbildung 23: Elastika von Gieson Färbung

Auch die Elastika von Gieson Färbung lieferte keine ergänzenden Informationen zur H&E Färbung. Beide Abbildungen zeigen eine nahezu vollständige Auflösung der grauen Rückenmarkssubstanz im Lumbalmark. Vergrößert dargestellt (Bild rechts) zeigt sich die Grenzzone der grauen (destruierten) und erhaltenen weißen Substanz. (Vergrößerung Bild links 40fach, Vergrößerung Bild rechts 200fach)

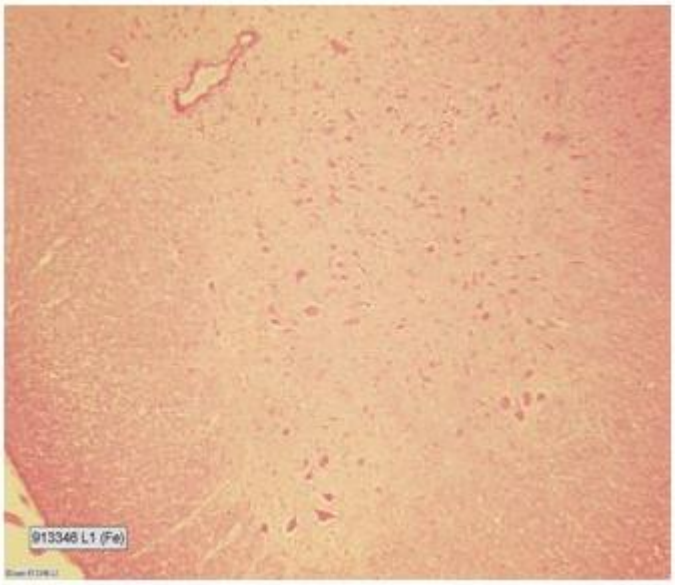

Abbildung 24: Eisenfärbung

In keinem Rückenmarkspräparat der Kaninchen zeigten sich nach Eisenfärbung Hinweise auf hämorrhagische Infarktkomponenten (kein Hinweis auf blaue Hämosiderinablagerungen). (Vergrößerung Bild 100fach)

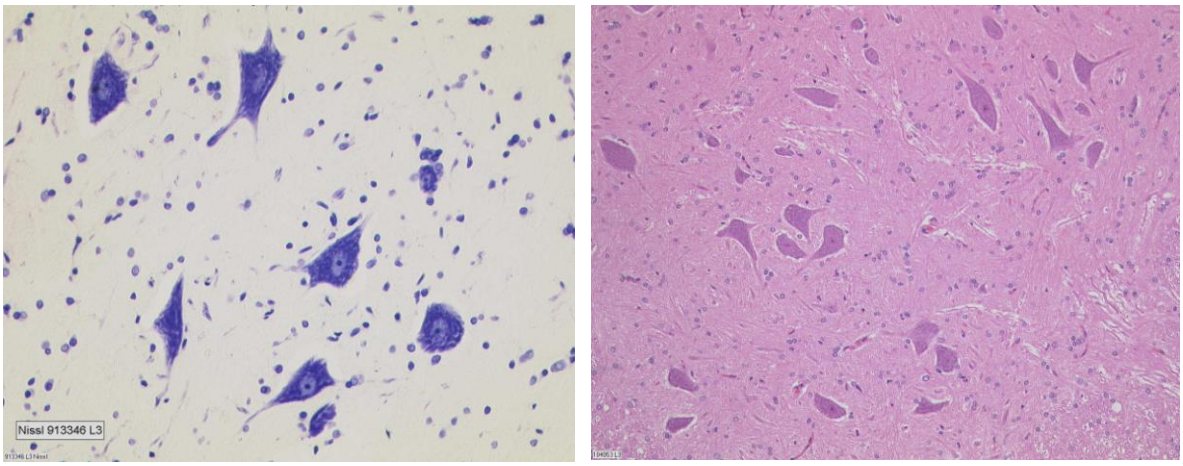

Abbildung 25: Nissl Färbung im Vergleich zur H&E Färbung

Die Nissl Färbung (links) lieferte im Vergleich zur H&E Färbung (rechts) keine zusätzlichen Informationen. In beiden Färbungen konnten vitale alpha Motoneurone gleichermaßen dargestellt werden. (Vergrößerung Bild links 400fach, Vergrößerung Bild rechts 200fach)

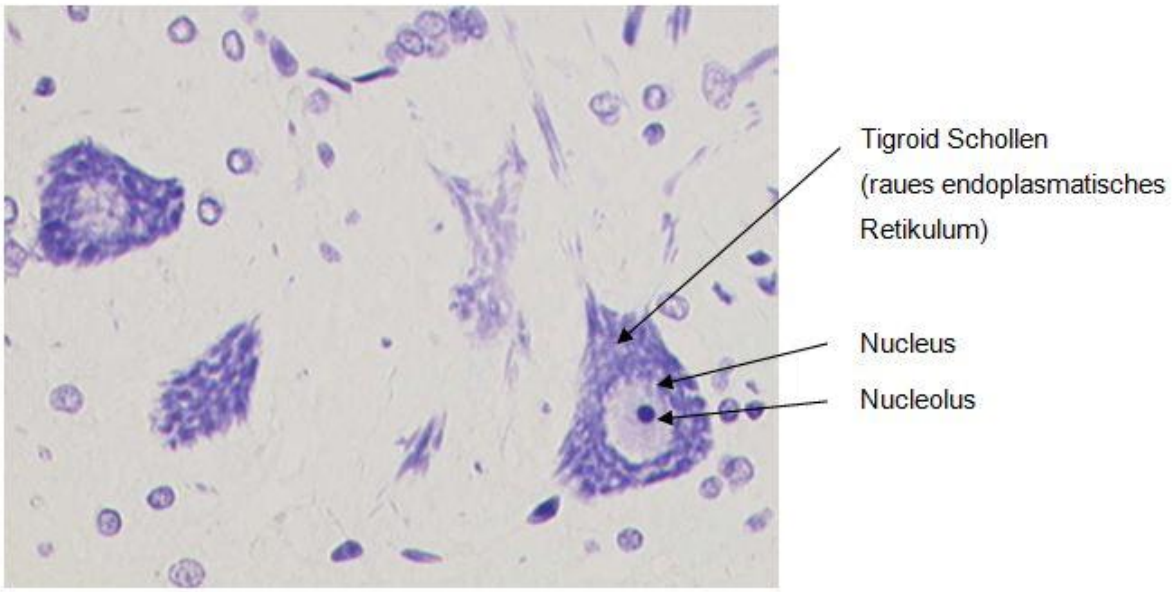

Abbildung 26: Nissl Färbung

Die Nissl Färbung zeigte ausschließlich alpha Motoneurone mit Tigroid Schollen, ein Charakteristikum für vitale Zellen. Tigrolysen konnten nicht gefunden werden. (Vergrößerung Bild 1000fach, Öl)

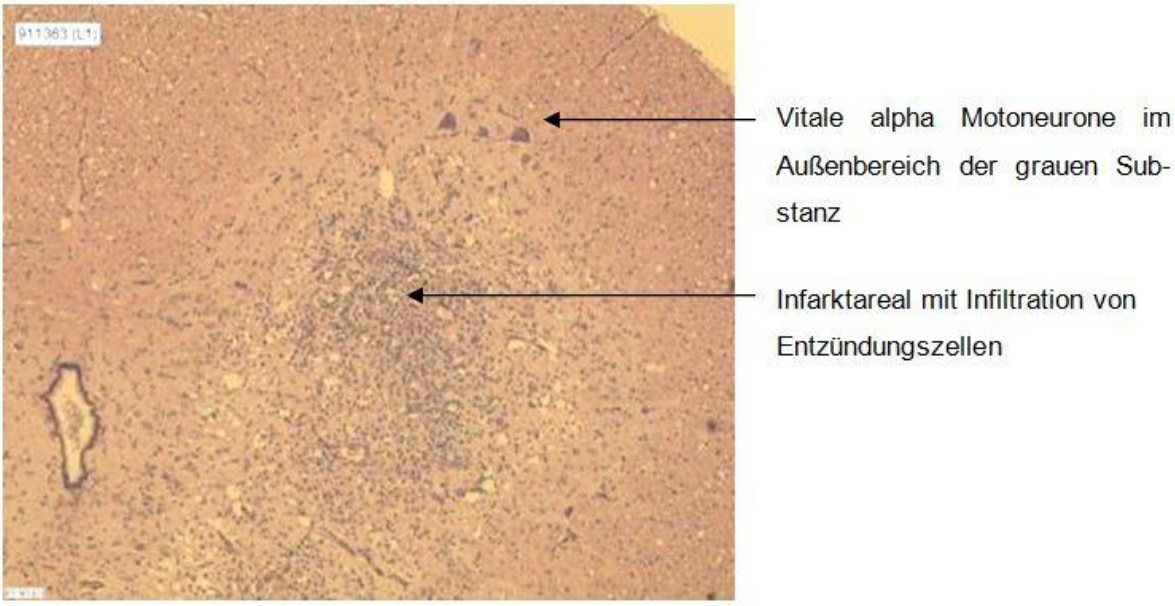

Abbildung 27: H&E Färbung Lumbalmark

Außenlokalisierte alpha Motoneurone waren von einer ischämischen Schädigung tendenziell weniger betroffen. (Vergrößerung Bild 100fach)

Bei keinem der explantierten Rückenmarksorgane konnte eine ischämische Schädigung in den thorakalen und thorakolumbalen Abschnitten gefunden werden. Eine explantationsbedingte ischämische Schädigung konnte somit ausgeschlossen werden.

Die H&E Färbung war ausreichend, um eine eindeutige Charakterisierung der histologischen Schädigungsmuster durchzuführen. Nachfolgende Abbildungen veranschaulichen den histologischen Klassifizierungsscore:

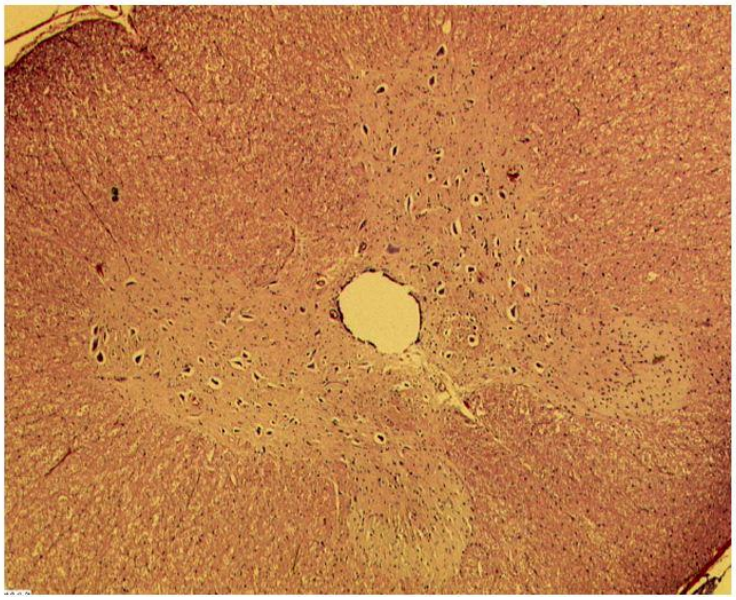

Abbildung 28: Schädigungsgrad 5

Physiologischer Rückenmarksquerschnitt. Im Bereich beider Vorderhörner sind zahlreiche intakte alpha Motoneurone sichtbar. Die graue Rückenmarkssubstanz ist frei von Entzündungszellen. Identische Ergebnisse wurden für alle thorakalen und thorakolumbalen Rückenmarkssegmente (Kontrollsegmente) gefunden. Klinisch wäre im vorliegenden Fall von keiner motorischen Einschränkung auszugehen. (Vergrößerung Bild 40fach)

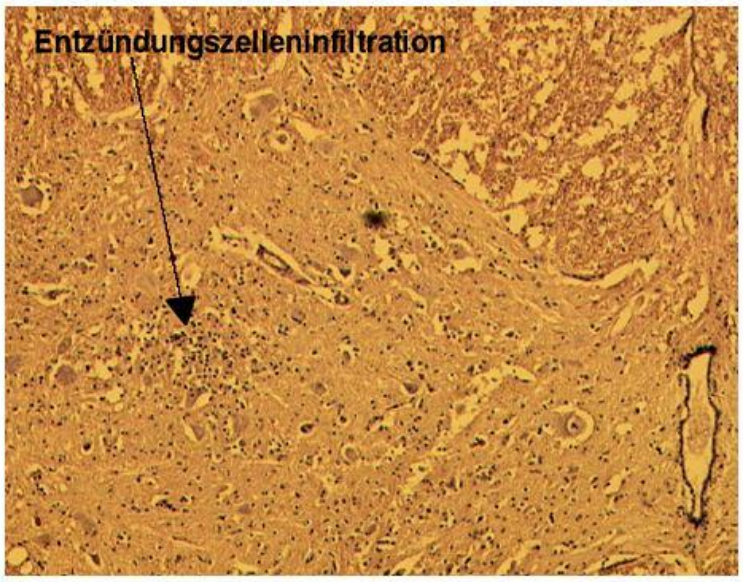

Abbildung 29: Schädigungsgrad 4

Einwanderung von Entzündungszellen (Rundzellen) in die graue Rückenmarkssubstanz. Die Morphologie und Integrität der alpha Motonneurone ist weitestgehend unbeeinträchtigt. Die Induktion der Ischämie führte hier noch nicht zur Ausbildung von demarkierten Infarktarealen. Im vorliegenden Bild ist mit einer allenfalls leichtgradigen Funktionseinschränkung der motorischen Fähigkeiten zu rechnen. (Vergrößerung Bild 100fach)

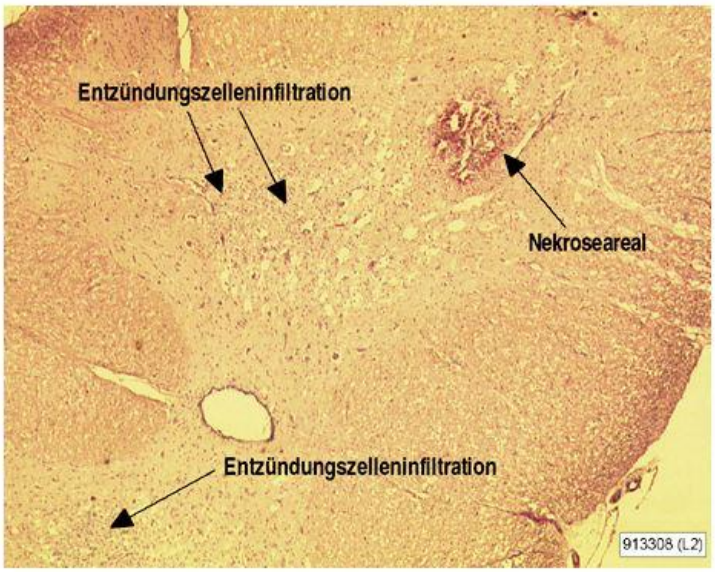

Abbildung 30: Schädigungsgrad 3

Im Bereich der grauen Substanz kam es zu einer zunehmenden diffusen Infiltration von Entzündungszellen. Im dargestellten Vorderhorn demarkiert sich ein Infarktareal. Die Ischämieprovokation war ausreichend, um einen fokalen Gewebeuntergang hervorzurufen. In diesem Stadium musste auch mit einem zunehmenden Verlust an alpha Motoneuronen gerechnet werden. Motorische Einschränkungen wären in diesem Fall durch die Histologie zu erklären.
(Vergrößerung Bild 40fach)

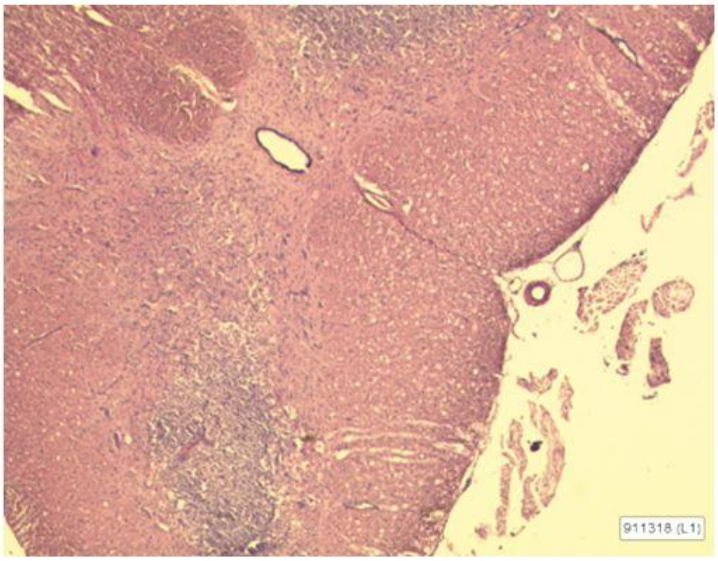

Abbildung 31: Schädigungsgrad 2

Im Schädigungsgrad 2 zeigte sich eine zunehmende Infiltration von Entzündungszellen mit konfluierenden Infarktzonen. Alpha Motoneurone waren in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Die graue Substanz konnte ihre morphologische Struktur weitestgehend erhalten. Auffällig war (wie hier im Bild) eine flächige Infiltration von Entzündungszellen. Diese stellte sich in der H&E Färbung dunkelblau dar. Ausgeprägte motorische Defizite wären bei diesem Schädigungsgrad zu erwarten.
(Vergrößerung Bild 40fach)

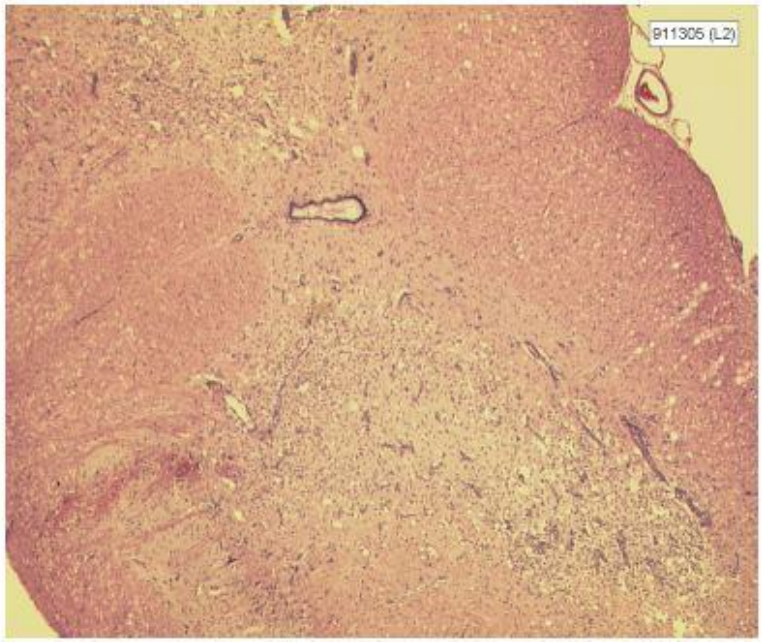

Abbildung 32: Schädigungsgrad 1

Im Stadium 1 zeigte sich eine zunehmende Infarzierung der gesamten grauen Substanz. Im Unterschied zum Schädigungsgrad 0 waren vereinzelt zelluläre Strukturen erhalten. Alpha Motoneurone waren zum Teil nicht mehr detektierbar. In diesem Fall muss bereits mit einer Paraplegie gerechnet werden.

(Vergrößerung Bild 40fach)

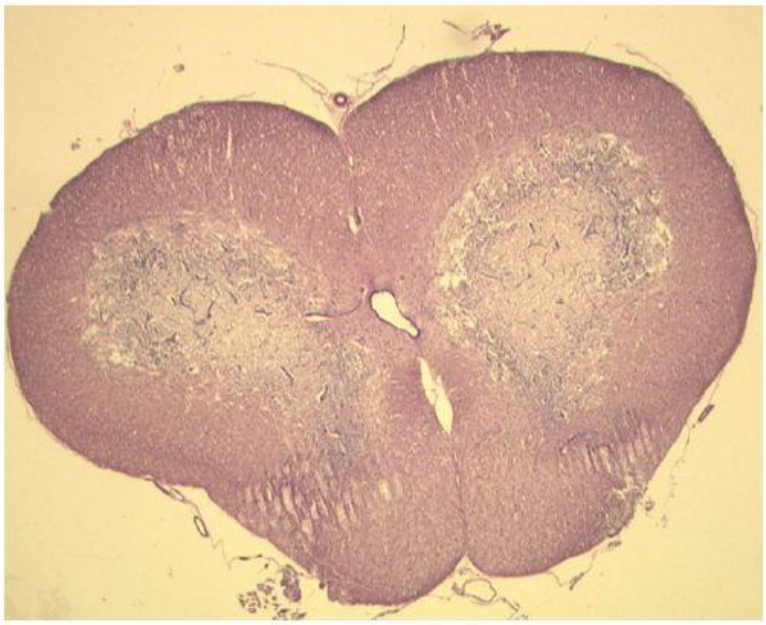

Abbildung 33: Schädigungsgrad 0

Komplette Auflösung der grauen Rückenmarkssubstanz.

(Vergrößerung Bild 20fach)

3.4 Auswertung der operativen Messparameter

Während den operativen Versuchsdurchführungen wurden Messparameter für die statistische Auswertung erfasst. Diese umfassten den invasiven Blutdruck, die Körpertemperatur, das Körpergewicht und den Narkoseverbrauch.

Die verabreichte Narkosemenge eines Tieres bezog sich auf die operative Versuchsdurchführung. Die Narkotisierung bei Organentnahme wurde nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Repräsentativ erfolgte die Auswertung des verabreichten Ketamins. Alle Versuchsgruppen hatten annähernd den gleichen Narkosebedarf (siehe Abbildung 34). Der Kruskal-Wallis Test konnte zwischen den Gruppen keinen statistischen Unterschied feststellen (p= 0,2232, jeweils p > 0,05 im Dunn's multiple comparison test). Eine Beeinflussung der klinischen und histologischen Ergebnisse durch die Narkosemedikation konnte somit ausgeschlossen werden.

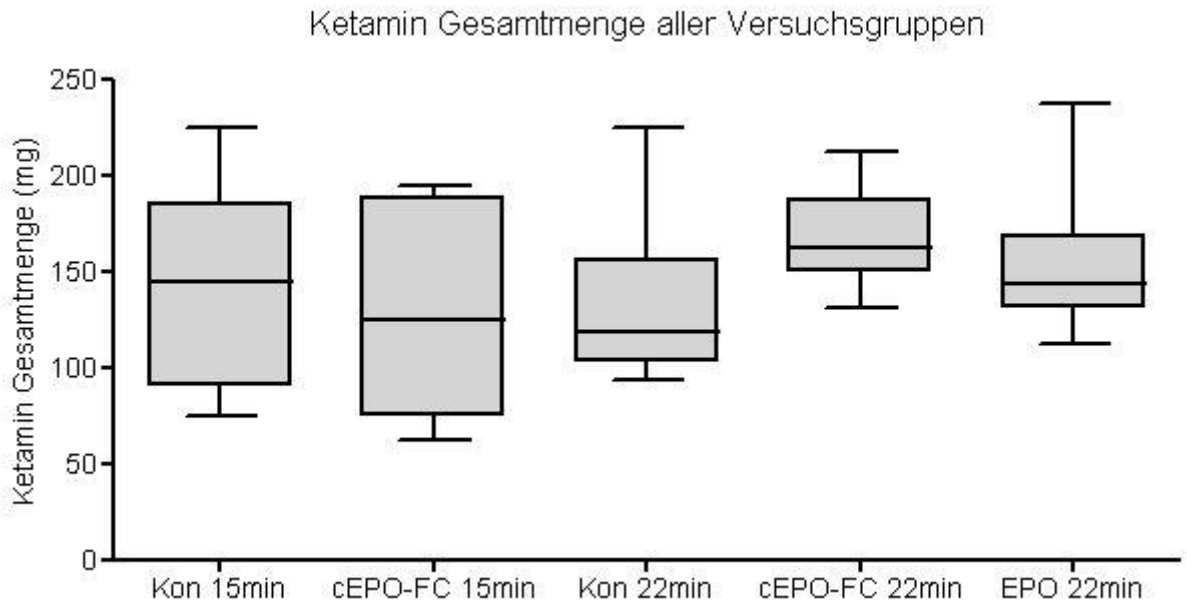

Abbildung 34: Gesamtnarkoseverbrauch (Ketamindosierung) aller Gruppen der ersten und zweiten Versuchsdurchführung

M (Ketamin in mg) Kontrolle 15min 144, cEPO-FC 15min 128, Kontrolle 22min 131, cEPO-FC 22min 165, EPO 22min 153

(Kon= Kontrolle)

In der ersten und zweiten Versuchsdurchführung wurden insgesamt 47 Tiere in einem Alter von 3-4 Monaten operiert und nachuntersucht. Das Gewicht der Tiere wurde vor Operation ermittelt.

Im ersten Versuchsablauf waren die Tiere im Durchschnitt 306 g schwerer als in der zweiten Versuchsdurchführung (siehe Abbildung 35). Innerhalb der beiden Versuchsdurchführungen (aortale Klemmzeit 15min bzw. 22min) konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden (15min Klemmzeit: p=0,7959; Mann Whitney Test / 22min Klemmzeit: p=0,2793; Kruskal Wallis Test).

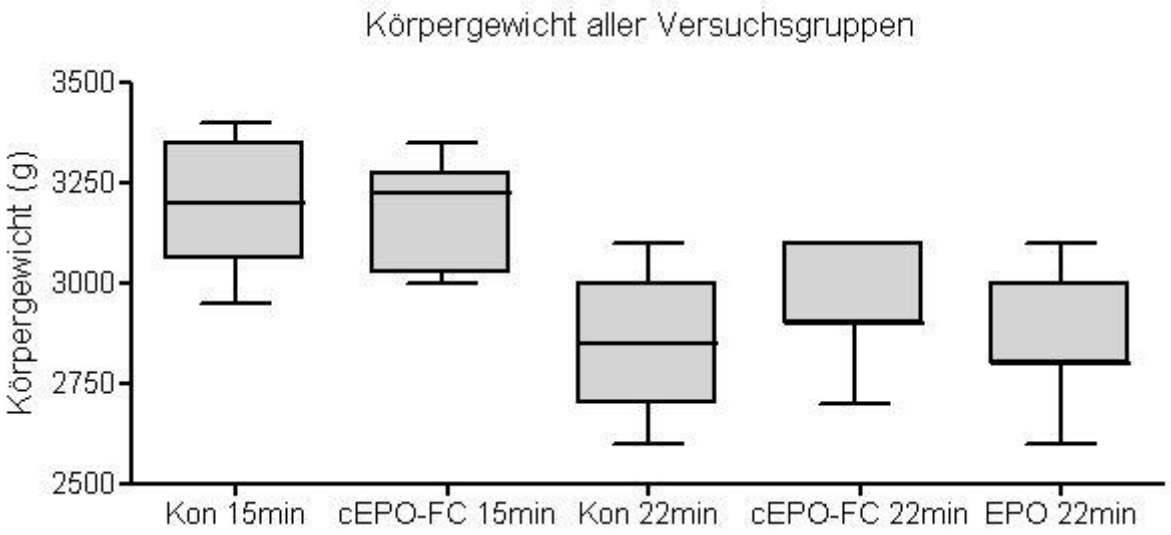

Abbildung 35: Auswertung des Körpergewichts der ersten und zweiten Versuchsdurchführung

M (Körpergewicht in g) Kontrolle 15min 3197, cEPO-FC 15min 3170, Kontrolle 22min 2840, cEPO-FC 22min 2957, EPO 22min 2860

(Kon= Kontrolle)

Perioperativ erfolgte eine kontinuierliche Messung der Körpertemperatur. Die gemessene Ausgangstemperatur konnte mit Hilfe einer elektrischen Wärmematte aufrecht erhalten werden. Diese Betrug im Mittel zwischen 37,6°C (cEPO-FC 15min) und 38,5°C (Kontrolle 22min).

Ein signifikanter Unterschied konnte innerhalb der Versuchsdurchführungen statistisch nicht errechnet werden (p= 0,0379; p jeweils >0,05; Kruskal-Wallis Test).

Systemische Fehler innerhalb der beiden Versuchsgruppen konnten in der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden.

Während der operativen Versuchsdurchführung wurde kontinuierlich der Blutdruck erfasst. Die invasive Messung erfolgte im Bereich der oberen Körperhälfte durch Punktion einer Ohrarterie. Nach Ausklemmung der infrarenalen Aorta wurde ein Anstieg des Blutdruckes registriert. Das Lösen der Gefäßklemmen führte zu einem Abfall des systemischen Blutdruckes. Einen Überblick über die systolischen Blutdruckwerte zu den Clamping - bzw. Declampingphasen geben nachfolgende Tabellen:

Tabelle 9: Systolischer Blutdruckanstieg (in mmHg) der ersten und zweiten Versuchsdurchführung bei Clamping der infarenalen Aorta

Die p-Werte (RR Anstieg) wurden mit dem Mann Whitney Test ermittelt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind unterstrichen dargestellt. (Cl= Clamping, RR= Blutdruck)

n=47	Kontrolle 15min	cEPO-FC 15min	Kontrolle 22min	cEPO-FC 22min	EPO 22min
M vor Cl	78,40	77,20	69,70	88,00	78,50
Md vor Cl	77,00	77,50	71,00	89,00	78,50
SD vor Cl	15,62	16,65	12,53	6,98	6,87
M nach Cl	97,00	92,60	80,50	110,71	92,30
Md nach Cl	96,00	95,00	83,00	111,00	91,50
SD nach Cl	15,27	13,62	11,56	11,27	8,72
p-Wert (RR-Anstieg)	0,0068	0,0433	0,0630	0,0012	0,0007

Bei allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der Kontrollgruppe 22min, konnte nach Ausklemmung der infrarenalen Aorta ein signifikanter Anstieg des systolischen Blutdruckes registriert werden (siehe Tabelle 9).

In der statistischen Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen zeigte die cEPO-FC 22min Studiengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 22min sowohl vor ($p \leq 0,05$, Dunn's multiple comparison test) als auch nach Clamping ($p < 0,001$, Dunn's multiple comparison test) eine statistisch signifikante Erhöhung des systolischen Blutdruckes (Kruskal-Wallis Paarvergleich). Alle übrigen Vergleiche der Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der registrierten Blutdruckwerte.

Tabelle 10: Systolischer Blutdruckabfall (in mmHg) der ersten und zweiten Versuchsdurchführung bei Declamping der infrarenalen Aorta

Die p-Werte (RR Anstieg) wurden mit dem Mann Whitney Test ermittelt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind unterstrichen dargestellt. (Cl= Clamping, RR= Blutdruck)

n=47	Kontrolle 15min	cEPO-FC 15min	Kontrolle 22min	cEPO-FC 22min	EPO 22min
M vor DCl	89,90	81,90	73,50	82,29	74,40
Md vor DCl	91,50	80,00	77,00	83,00	67,50
SD vor DCl	9,47	7,95	16,17	6,26	15,04
M nach DCl	61,40	54,90	48,30	56,29	43,10
Md nach DCl	61,50	53,00	47,00	54,00	38,00
SD nach DCl	10,12	8,54	11,45	7,97	10,08
p-Wert (RR-Abfall)	<0,0001	<0,0001	0,0015	0,0006	<0,0001

Nach Lösen der Gefäßklemmen konnte bei allen Versuchsgruppen ein signifikanter Abfall des systolischen Blutdruckes registriert werden (siehe Tabelle 10). Der Abfall des Blutdruckes war während der Declampingphase bei allen Versuchsgruppen größer und statistisch relevanter als der registrierte Anstieg während der Clampingphase.

In der statistischen Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen zeigte sich eine statistische Diskrepanz zwischen der Kontrollgruppe 15min und der EPO 22min Gruppe. Der Unterschied war sowohl vor (p-Wert< 0,05, Dunn's multiple comparison method test) als auch nach Declamping (p-Wert< 0,01, Dunn's multiple comparison method test) statistisch signifikant (Kruskal Wallis Test). Alle übrigen Vergleiche der systolischen Blutdruckwerte vor bzw. nach Declamping blieben ohne statistische Signifikanz.

Während dem Clamping bzw. Declamping wurde eine taktile Pulskontrolle über dem ausgeklemmten Aortenabschnitt durchgeführt. Bei allen Tieren bestand hier nach Setzen der Gefäßklemmen eine Pulslosigkeit.

Alle Operationen wurden von 3 unterschiedlichen Operateuren durchgeführt. Diese waren hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet.

Zum Ausschluss einer operateurbedingten Beeinflussung des klinischen Outcomes wurden die 96h Tarlov Werte der jeweiligen Operateure miteinander verglichen. Ein Unterschied konnte statistisch mit dem Mann Whitney Test nicht bestätigt werden (Kontrolle 15min: Md 2,75 (Operateur 1) vs. Md 4,4 (Operateur 2); p=0,1714 / cEPO 15min: Md 2,38 (Operateur 1) vs. Md 3,63 (Operateur 2); p=0,9143 / Kontrolle 22min: Md 0,00 (Operateur 1) vs. Md 0,63 (Operateur 3); p-Wert nicht ermittelbar, da Operateur 3 n=2).

4. Diskussion

Das beschriebene Kaninchenmodell zur Untersuchung von Ischämie und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach aortalem Crossclamping basiert auf bereits von anderen Gruppen durchgeführten Tierversuchen. Während der Literaturrecherche zur Planung unseres Kaninchenmodells zeigten sich große Unterschiede hinsichtlich Versuchsdurchführung, Narkoseform, Klemmzeitintervall und der klinischen und histologischen Beurteilung.

4.1 Ermittlung der aortalen Klemmzeit

Versuche am Kaninchen zur Induktion einer spinalen Ischämie wurden mit unterschiedlichen Klemmzeiten durchgeführt. Lee [94] wählte ein Clampingintervall von 15min, andere Autoren legten die Ausklemmzeit auf 25min [69], 30min [12, 84, 113] oder gar 40min [90] fest. Alle Studiengruppen konnten dadurch eine vergleichbare spinale Ischämie mit resultierender Paraplegie der Hinterläufe induzieren. Die Ergebnisse erscheinen aufgrund der großen Diskrepanz der Klemmzeitintervalle schwer nachvollziehbar, da unsere Versuche auf ein enges kritisches Zeitfenster hindeuten, in dem therapeutische Versuche sinnvoll erscheinen. Unsere Versuche belegen, dass eine aortale Klemmzeit von 15min nicht ausreichend ist, um im Kaninchenmodell eine einheitliche spinale Schädigung zu erzielen. Die statistische Auswertung der ersten Versuchsdurchführung, mit einer Clampingzeit von 15min, zeigte eine große Streubreite der Tarlov Indizes im postoperativen Verlauf. Eine tierspezifische Varianz der klinischen Ergebnisse nach Crossclamping der Aorta beim Kaninchen [166] konnte durch unsere Ergebnisse für Klemmzeiten unter 22min bestätigt werden. Bei Aortenausklemmungen über 22min hinaus fanden wir eine irreversible spinale Schädigung, die durch eine pharmakologische Konditionierung nur fraglich therapierbar wäre. Die Ergebnisse der ersten Versuchsdurchführung waren aufgrund ihrer geringen Reproduzierbarkeit und hohen klinischen Varianz für pharmakologische Testversuche ungeeignet und führten zu einer kritischen Hinterfragung des Modells.

Nach Reevaluation der Klemmzeit konnte gezeigt werden, dass das optimale Zeitintervall zur Induktion einer spinalen Ischämie beim Kaninchen bei 22min liegt. In diesem kritischen Zeitfenster liegt das größte therapeutische Potential.
Mit zunehmender Clampingzeit beobachteten wir postoperative Streckkrämpfe, die sich durch die Gabe von Midazolam sowohl prophylaktisch, als auch im akuten Anfall therapieren ließen. In der Literatur finden sich bei Ischämieversuchen am Kaninchen keine Angaben bezüglich dieser neurologischen Symptomatik. Die Streckkrämpfe traten unabhängig von der pharmakologischen Konditionierung gleichermaßen in allen Gruppen auf. Da sie mit zunehmender Klemmzeitdauer beobachtet wurden, kann ihre Ätiologie am ehesten als Folge eines spinalen Schocks interpretiert werden. Durch die prophylaktische Midazolamgabe in den ersten postoperativen Stunden konnte die Inzidenz an Krampfanfällen verhindert werden, was dazu führte, dass alle Tiere der zweiten Versuchsdurchführung eine einmalige Midazolamgabe erhielten. Eine Beeinflussung der Ergebnisse konnte somit ausgeschlossen werden.

4.2 Beurteilung des Tiermodells

Insgesamt erwies sich das entwickelte Kaninchenmodell als geeignet, um pharmakologische Konditionierungsversuche zur Prophylaxe von Ischämie - und Reperfusionsschäden nach aortalen Crossclamping zu untersuchen. Klinische und histologische Parameter ließen sich mit den beschriebenen Methoden (Tarlov -, Ischämie Score) gut erfassen.
Im Vergleich zu Großtierversuchen erwies sich das entwickelte Kaninchenmodell in vielerlei Hinsicht als vorteilig. Aufgrund der schnellen postoperativen Erholung war eine sofortige klinische Beurteilung der Tiere möglich. In unseren Vorversuchen am Schweinemodell handelte es sich um Terminalversuche. Ischämie - und Reperfusionsversuche waren auf histologische und perioperative Parameter beschränkt. Eine klinische Beurteilung am wachen Tier war postoperativ nicht möglich. In diesem Fall musste zur Beurteilung der Rückenmarksfunktion ein

Monitoring motorisch evozierter Potentiale oder peripherer Reflexe angewendet werden [134, 135].

Inwieweit diese Methoden das klinische und histologische Outcome nach ischämischer Rückenmarksschädigung prognostizieren können, ist umstritten [72, 75]. Klinische und histologische Schäden sind unter Umständen während der perioperativen Beurteilung noch nicht vollständig ausgereift und nur bedingt feststellbar. Der Vorteil des Kaninchenmodells besteht darin, dass neurologische Funktionsprüfungen postoperativ am wachen Tier durchgeführt werden können.

Zivin entwickelte bereits 1980 ein Kaninchenmodell zur Induktion einer spinalen Ischämie. Er verwies auf die sichere Reproduzierbarkeit des neuronalen Schadens nach infrarenalem Clamping. Ursächlich hierfür ist die rein segmentale Blutversorgung des Rückenmarks beim Kaninchen. Eine postoperative Nachbeobachtung war nach Induktion einer spinalen Ischämie für bis zu zwei Wochen möglich [166].

Aufgrund der infrarenalen Klemmlokalisation kann die Nieren - und Darmperfusion ohne Unterbrechung aufrecht erhalten werden. Durch die doppelte Aortenausklemmung (direkt infrarenal und auf Höhe der Aortenbifurkation) war klinisch und histologisch eine spinale Ischämie provozierbar. Diese versuchten wir mit Hilfe von nativem und carbamyliertem Erythropoietin zu beeinflussen.

Der Narkosebedarf der Tiere zwischen erster und zweiter Versuchsdurchführung zeigte statistisch keinen Unterschied. Gemäß graphischer Darstellung hatte die cEPO-FC Studiengruppe des zweiten Versuchsablaufs die größte Menge an Ketamin erhalten. Die statistische Auswertung dieser Gruppe zeigte mitunter die geringste Verbesserung der postoperativen Paraplegie. Yu et al. konnte belegen, dass Ketamin nach Induktion einer spinalen Ischämie beim Kaninchen einen protektiven Effekt aufweist. Ketamin zeigte in diesem Zusammenhang ionenstabilisierende und antioxidative Wirkeigenschaften im hypoxischem Gewebe [163, 164]. Die Menge des verabreichten Ketamins stand in unseren Versuchen in keiner statistischen Korrelation zum klinischen oder histologischen Outcome. Ein systemischer Fehler wird diesbezüglich nicht angenommen.

Auch die Art der Narkotisierung weißt in den Ischämie - und Reperfusionsmodellen anderer Gruppen deutliche Unterschiede auf. Das von uns verwendete Narkosegemisch wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen ange-

wandt [12, 84, 90, 112]. Im Gegensatz zur intramuskulären Applikationsform führten wir eine total intravenöse Anästhesie (TIVA) durch. Smiler konnte 1990 an Ratten nachweisen, dass eine intramuskuläre Ketamin-Xylazin Applikation zu Muskelschwäche und Gewebsnekrosen führen kann [138]. Diese Nebenwirkung hätte in unserem Tiermodell die klinischen Untersuchungen beeinflussen können, weshalb eine TIVA zur Anwendung kam.

Nach perioperativer Bolusgabe des Ketamin-Xylazingemisches kam es paradoxerweise stets zu einem kurzzeitigen Abfall des systemischen Blutdruckes. Dies kann nach ausführlicher Literaturrecherche nicht abschließend erklärt werden, zumal Xylazin durch Stimulation peripherer α_2-Adrenozeptoren initial zu einem Blutdruckanstieg mit Verminderung der Herzfrequenz führt [120]. Beide Wirkstoffe sollten nach intravenöser Applikation zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen.

Die prokonvulsive Wirkung von Ketamin wird kontrovers diskutiert [37, 86]. Postoperative Streckkrämpfe traten in unseren Versuchen mit zunehmender Dauer der Aortenausklemmung auf. Die Menge des verabreichten Ketamins war innerhalb der Versuchsgruppen weitestgehend identisch. Eine dosisabhängige Korrelation zur prokonvulsiven Wirkung konnte nicht gefunden werden.

Während den Operationen wurden Vitalparameter für die statistische Auswertung erhoben.

Insgesamt wurden 76 Tiere operiert, wovon bei 73 Tieren ein Anstieg des systemischen Blutdruckes nach Aortenokklusion registriert wurde. Alle Tiere zeigten nach Lösen der Gefäßklemmen einen Abfall des Blutdrucks. Die Gefäßklemmung war in allen Fällen korrekt durchgeführt worden. Die taktile Pulskontrolle bestätigte bei allen Tieren eine kollabierte Aorta während der Clampingphase.

Der fehlende Blutdruckanstieg der drei erwähnten Tiere kann dadurch erklärt werden, dass kurz vor dem Aortenclamping häufig ein Narkosebolus zur Vertiefung der Analgosedierung erforderlich war. Für die Präparation der beiden aortalen Klemmlokalisationen war aufgrund der Schmerzinnervierung des Retroperitoneums ein erhöhter Narkosebedarf erforderlich. Nach Bolusapplikation von Ketamin und Xylazin wurde regelmäßig ein kurzzeitiger Abfall des systemischen Blutdruckes registriert. Der Blutdruck könnte deshalb während der Clampingphase verfälscht werden.

Nach erfolgter Präparation der Klemmlokalisationen war bis zum Verschließen des Abdomens in der Regel keine weitere Narkosegabe erforderlich. Der Blutdruckabfall nach Lösen der Gefäßklemmen blieb folglich unbeeinträchtigt. Der Abfall des systemischen Blutdrucks war bei allen Versuchsgruppen größer als der zuvor gemessene Anstieg des Blutdrucks.

Wenige experimentelle Studien untersuchten die kardiovaskulären Effekte nach aortalem Crossclamping. Ein Anstieg des proximalen Blutdrucks nach Clamping der Aorta wird einheitlich beschrieben [10, 55, 160]. Ein statistisch signifikanter Anstieg des Blutdrucks nach Aortenokklusion ließ sich jedoch nicht in allen Studien belegen [10, 34]. Roizen hatte 1984 gezeigt, dass eine infrarenale Ausklemmung der Aorta zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks um 2% führt. Je proximaler die Klemmlokalisation gewählt wurde, desto größer war der Anstieg des Blutdrucks während der Clampingphase. Die supratruncale Ausklemmung führte schließlich zu einer 50%igen Erhöhung des Ausgangsblutdrucks [121]. In unseren Versuchen zeigten alle Versuchsgruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe 22min einen statistisch signifikanten Anstieg des systemischen Blutdrucks. Wie eingangs erwähnt kann der fehlende Blutdruckanstieg der Kontrollgruppe auf eine narkosebedingte Verfälschung zurückzuführen sein.

Anders präsentierte sich der Blutdruckabfall nach Declamping der Aorta. Hier zeigten alle Versuchsgruppen eine statistische Signifikanz. Cronenwett untersuchte hämodynamische Auswirkungen des infrarenalen Clampings an Hunden. Er registrierte nach Setzen der Gefäßklemmen einen verzögerten Anstieg des systemischen Blutdrucks und nach Declamping einen Abfall des Blutdrucks [34].

Eine aortale Okklusion geht unmittelbar mit einer Abnahme des kardialen Outputs einher [10, 55, 160]. Nach einer gewissen Adaptionsphase an den gesteigerten Afterload reagiert das Herz mit einer Erhöhung des Cardiac Index [34]. Der Physiologe Anrep beschrieb 1912 einen Autoregulationsmechanismus des Herzens, der in diesem Zusammenhang beteiligt sein könnte. Eine Zunahme des Afterloads führt nach einer gewissen Adaptionsphase zu einer Erhöhung der ventrikulären Inotropie (Anrep Effekt). Dies würde den Anstieg des Cardiac Index vor Declamping im Tierversuch von Cronenwett erklären.

Der Abfall des systemischen Blutdruckes nach Declamping war in unseren Versuchen stärker als der registrierte Blutdruckanstieg nach Clamping der Aorta.

Eine ausgeprägte Hypotension nach Declamping der Aorta mit der Gefahr eines Herzstillstandes wurde in den 1960er Jahren auch als „Declamping Shock“ bezeichnet [96]. Vermutlich kommt es mit zunehmender Klemmzeit zu einer Vasodilatation im Bereich des ischämischen Gewebes. Eine „reaktive Hyperämie“ bewirkt nach Lösen der Gefäßklemmen einen plötzlichen Abfall des Afterloads (distributiver Schock) [51, 96]. Eine perioperative Volumentherapie kann diesem Effekt entgegenwirken [114]. In unseren Versuchen wurden durch das Declamping keine hypotonen Schockzustände induziert.

Problematisch gestaltete sich im Kaninchenmodell die Messung der arteriellen Sauerstoffsättigung. Ein Pulsoxymeter konnte an keiner geeigneten Körperstelle zur Messung platziert werden. Ketamin kann insbesondere nach intravenöser Gabe eine atemdepressive Wirkung induzieren, mit der Folge von Apnoe, Hypoxie und Hyperkapnie [24, 40]. Ein Atemstillstand wurde in unseren Versuchen bei keinem Tier beobachtet. Alle Tiere zeigten während der Operation eine Spontanatmung. Ob diese ausreichend war, um eine suffiziente Oxygenierung zu gewährleisten, konnte nicht endgültig geklärt werden. Perioperative Blutgasanalysen könnten die Sauerstoffsättigung und metabolischen Parameter in Hinblick auf pathophysiologische Auswirkungen des Aortenclampings untersuchen. Viele Untersuchungen am Menschen und im Tiermodell zeigten nach aortalem Crossclamping einen Anstieg des Serum Laktats und die Entwicklung einer metabolischen Azidose [47, 98, 114]. Interessanterweise ist der metabolische Effekt von bestehenden Grunderkrankungen abhängig. Patienten mit einer chronischen Ischämie der unteren Extremität, beispielsweise hervorgerufen durch eine periphere arterielle Verschlusskrankheit, zeigten nach infrarenalem Crossclaping der Aorta eine mildere Azidose [43, 55].

Grubbs postulierte 1988 in einem Hundemodell, dass der Rückenmarksperfusionsdruck während des aortalen Crossclampings das neurologische Outcome bestimmt [60]. Dieser berechnet sich aus der Differenz des arteriellen Drucks distal der Aortenklemmung und dem zerebrospinalen Druck.

In unseren Versuchen wurde lediglich der arterielle Blutdruck proximal der Gefäßklemme erfasst. Ketamin könnte durch Erhöhung des zerebrospinalen Drucks einen neuroprotektiven Effekt reduzieren [9, 53], wenngleich es als einziges Narkotikum blutdruck - und herzfrequenzsteigernd wirkt. Ein Spinalkatheter zur

Messung und Reduktion des zerebrospinalen Druckes könnte in einem erweiterten Tiermodell die Neuroprotektion zusätzlich verstärken. Die Anlage wäre im Kaninchenmodell technisch anspruchsvoll und könnte zu rückenmarksnahen Hämatomen mit Auswirkungen auf die klinische Evaluation führen.

Nach einer postoperativen Beobachtungszeit von 24-36h war einheitlich eine Verschlechterung der motorischen Funktion zu beobachten. Sollte dies auf ein fortschreitendes Ödem des Rückenmarks zurückzuführen sein, wäre mit einem Anstieg des zerebrospinalen Druckes in der späten Nachbeobachtungsphase zu rechnen. Mit Hilfe eines Spinalkatheters könnten postoperative Anstiege des Liquordrucks registriert und untersucht werden. Ob die Tiere nach Operation einen Spinalkatheter tolerieren würden, bleibt fraglich. Mit zunehmender Dauer der klinischen Nachbeobachtung steigt zudem das Risiko einer Katheterdislokation und katheterassoziierten Infektion.

Alblas untersuchte 2012 den radiologischen Verlauf spinaler Infarkte mittels Magnetresonanztomographie. Innerhalb der ersten 24h war radiomorphologisch kein pathologischer Befund zu erkennen. Nach 1-2 Tagen zeigten alle Patienten eine fokale Hyperintensität und Rückenmarksschwellung [6]. Dies würde zeitlich zu unseren Beobachtungen der motorischen Verschlechterung passen.

Jacobs beschrieb bereits 1987 das Phänomen der sekundären motorischen Dysfunktion nach Okklusion der Aorta beim Kaninchen. Nach einer kompletten postoperativen Paraplegie beobachtete auch er bei 70% der Kaninchen eine Verbesserung der klinischen Fähigkeiten nach ca. 4h. Mit zunehmender Nachbeobachtungszeit bis 20h kam es, wie in unseren Versuchen, zu einer erneuten Verschlechterung der Motorfunktion. Die sekundäre motorische Dysfunktion basierte nach seinen Erkenntnissen auf einer lokalen Konzentrationserhöhung von Thromboxan B2 und einer Ödementwicklung der grauen und weißen Substanz 18h nach Reperfusion [70].

Inwieweit Erythropoietin auch einen positiven Effekt auf die Reperfusionsphase hat konnte durch unsere Versuche nicht gezeigt werden. Eine verlängerte Applikation von Erythropoietin wäre nach Ischämieinduktion zur Testung nötig.

Die Temperatur wurde mit einer rektalen Temperatursonde kontinuierlich gemessen und mit einer elektrischen Heizmatte aufrecht erhalten. Alle Tiere befanden sich perioperativ in Rückenlage. Die Heizstärke war moderat, um eine rücken-

marksnahe Hyperthermie zu verhindern. Durch die abdominelle Rasur und mediane Laparotomie musste mit einem Abfall der Körpertemperatur gerechnet werden.

Zahlreiche Studien belegen den neuroprotektiven Effekt einer moderaten Hypothermie zur Prophylaxe einer spinalen Ischämie [122, 127, 142, 158]. Sollte sich durch eine lokale Hyperthermie die spinale Ischämie in unseren Versuchen potenziert haben, wäre dies ein systemischer Fehler mit Einfluss auf alle Versuchsgruppen. Innerhalb der beiden Versuchsdurchführungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpertemperatur.

Für beide Versuchsdurchführungen wurden zwei getrennte Tierbestellungen in Auftrag gegeben. Das Körpergewicht unterschied sich trotz gleicher Altersangabe. Die Dosierung der pharmakologischen Konditionierung wurde für jedes Tier individuell berechnet. Alle Tiere erhielten auf das entsprechende Körpergewicht bezogen die gleiche Dosierung an Medikamenten.

Die erste und zweite Versuchsdurchführung unterschied sich hinsichtlich der gewählten Nachbeobachtungszeitpunkte. Im ersten Versuchsablauf wurde die erste postoperative Kontrolle nach 6h durchgeführt. Eine vollständige Narkoseerholung war bereits nach der ersten postoperativen Stunde festzustellen. Eine spontane Bewegung der Vorderläufe konnte stets beobachtet werden. Die postoperative Plegie der Hinterläufe war somit nicht mit einem Narkoseüberhang zu erklären. Nach dieser Erkenntnis wurde die erste klinische Nachbeobachtung im zweiten Versuchsdurchlauf bereits nach 2h durchgeführt.

Im Gegensatz zur spinalen Blutversorgung des Menschen besteht beim Kaninchen eine rein segmentale Blutversorgung des Rückenmarks. Durch eine Okklusion der Aorta beim Kaninchen ist mit einem sicheren spinalen Schaden zu rechnen [166]. In unseren Versuchen konnten insgesamt 65 Tiere histologisch ausgewertet werden. Nach infrarenaler Aortenausklemmung war ein ischämischer Schaden ausschließlich auf die Lumbalsegmente begrenzt. Im histologischen Beurteilungsscore wurde lediglich die graue Rückenmarkssubstanz beurteilt. Zivin et al. beschrieb bereits 1980 in einem Ischämie - und Reperfusionsmodell am Kaninchen, dass der histologische Schaden vornehmlich im Bereich der grauen Rückenmarkssubstanz auftritt [166]. Die Beurteilung eines Schadens der weißen Substanz gestaltet sich als aufwendiger und konnte in unseren Präparaten nicht

eindeutig durchgeführt werden. Die immunhistochemische Analyse geschädigter Axone und Oligodendrozyten kann neben einer verstärkten Vakuolenbildung zur Einschätzung eines ischämischen Schadens der weißen Rückenmarkssubstanz herangezogen werden [88, 89, 148]. Eine ausgeprägte Vakuolenbildung der weißen Substanz konnte in unseren Präparaten morphologisch nicht gefunden werden. Einige Autoren verweisen auf ischämische Schädigungen der weißen Substanz [50, 76, 80]. Inwiefern eine Schädigung der absteigenden Pyramidenbahn das klinische Outcome zusätzlich verschlechtert, kann abschließend nicht sicher beurteilt werden.

Mit zunehmender Dauer der Klemmzeit zeigte die Histologie eine deutlichere Korrelation zur Klinik. Ab einer aortalen Klemmzeit von 22min konnte die Streubreite der klinischen und histologischen Ergebnisse reduziert werden.

Die EPO Studiengruppe konnte histologisch keine statistische Verbesserung gegenüber den anderen Versuchsgruppen erzielen. Womöglich unterstützt dies unsere Vermutung, dass Eryhtropoietin nur in der frühen Phase der Reperfusion einen protektiven Einfluss auf das klinische Outcome nimmt. Die Histologie wurde am vierten postoperativen Tag entnommen und repräsentiert unter Umständen die klinischen Ergebnisse der späten Nachbeobachtungsphase. Eine prolongierte Applikation von Erythropoietin könnte einen protektiven Einfluss auf die Histologie nehmen.

Es ist davon auszugehen, dass eine ischämische Schädigung erst nach einer gewissen Zeit histomorphologisch zur Darstellung kommt. Großtierversuche mit einer unmittelbar postoperativen Gewebeentnahme können unter Umständen das Gesamtausmaß einer ischämischen Schädigung nicht adäquat abbilden. Auch eine entzündliche Infarktgenese wäre auf ein postoperatives Zeitintervall angewiesen.

Kurita et al. untersuchte 2006 die histologischen Schädigungen des Rückenmarks nach aortalem Crossclamping beim Kaninchen [89]. In der grauen Substanz zeigte sich nach frühestens 24h eine nachweisbare Reduktion der Motoneurone. Ein Maximum wurde nach 96h beobachtet. Der ischämische Schaden der weißen Substanz kam frühestens nach 96h zur Darstellung.

Aufgrund der viertägigen klinischen Nachbeobachtungszeit war histologisch mit ausgereiften Infarkten und Zelluntergängen zu rechnen. Eine immunhistologische

Untersuchung auf Apoptoseparameter wäre nach Rücksprache mit den Kollegen der Neuropathologie lediglich in den ersten Stunden nach aortalem Crossclamping erfolgsversprechend gewesen. Dies konnte in der H&E Färbung bestätigt werden. Es kamen ausschließlich physiologisch intakte Motoneurone oder ausgereifte Infarktareale zur Darstellung.

Schneider beschrieb 1980 histologische Auswirkungen rückenmarksassoziierter Kreislaufstörungen. Ischämische Rückenmarksschädigungen sind nach seiner Erkenntnis vorwiegend in der grauen Substanz lokalisiert. Eine Ödementwicklung oder venöse Abflussstörung kann zusätzlich zu einer Nekrose der weißen Substanz führen. Nach moderater Ischämiewirkung zeigen sich fokale Ganglienzelluntergänge vorwiegend in den zentralen Regionen der grauen Rückenmarkssubstanz (Rexed Laminae VI und VII) [131]. Dies konnte in unseren Versuchen ebenfalls beobachtet werden. In der grauen Substanz außen lokalisierte Ganglienzellen waren von ischämischen Schädigungen am wenigsten betroffen.

Hämorrhagische Infarktkomponenten des Rückenmarks nach arterieller Zuflussstörung wurden von Schneider nicht beschrieben. Diese waren unter anderem mit Trauma, Myelomalazien und Schädigungen der weißen Substanz assoziiert [131]. Mit Hilfe der Eisenfärbung konnten in unseren Präparaten keine Hinweise auf stattgehabte Hämorrhagien gefunden werden.

4.3 Natives - und carbamyliertes Erythropoietin

Erythropoietin weißt neben der Steigerung der Erythropoese weitere pleiotrope Effekte auf. Letztere Wirkeigenschaften sind auf eine ubiquitäre Verteilung eines heterodimeren EPO Rezeptors zurückzuführen [19]. Die Expression des Rezeptors wird durch ischämische Stoffwechselprozesse im geschädigten Gewebe hochreguliert [15, 18, 36, 124]. Protektive Wirkeigenschaften sind für Herz, Nieren, Retina und das Nervensystem beschrieben [8, 115]. In der Akutphase der Gewebsschädigung könnte Erythropoietin direkt durch rezeptorvermittelte Kaskaden den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindern [58]. Auch eine NO vermittelte Deaktivierung von proapoptotischen Kaskaden [99, 102] und Hemmung einer

glutamatassoziierten Neurotoxizität kann durch Erythropoietin begünstigt werden [79]. In der Folge werden sekundäre proinflammatorische Mediatoren in geringerer Konzentration freigesetzt. In der Spätphase einer stattgehabten Gewebsschädigung könnte Erythropoietin die Regeneration und Heilung unterstützen. Mitunter ist dies auf angiogenetische Wirkeigenschaften zurückzuführen [5, 118]. Carbamyliertes Erythropoietin konnte durch Stimulation des heterodimeren EPO Rezeptors eine verbesserte Wundheilung erzielen. Unter cEPO Therapie war dies mit einer signifikant geringeren Serumkonzentration an TNFα zu erklären [45].

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass das carbamylierte EPO Derivat eine verminderte Bindung zum homodimeren Rezeptor aufweist und somit keine Steigerung der Erythropoese hervorruft. Die Affinität am heterodimeren Geweberezeptor, der für neuroprotektive Effekte verantwortlich gemacht wird, blieb dabei unbeeinträchtigt [18, 31, 95].

Für den Menschen besteht eine Zulassung des nativen Erythropoietins zur Therapie von Anämien durch Tumorerkrankungen oder chronischer Niereninsuffizienz. Als Nebenwirkungen der Dauertherapie traten Blutdrucksteigerungen mit erhöhter kardialer Sterblichkeit, thrombembolische Komplikationen und vereinzelt Tumorprogressionen auf [147]. Die Mortalität einiger Tumorpatienten war unter chronischer EPO Einnahme gesteigert [65, 97]. Tumorzellen könnten zur Wachstumsstimulation EPO-Rezeptoren exprimieren.

Welcher EPO Rezeptortyp für diese Ereignisse verantwortlich gemacht werden kann, ist bislang ungeklärt. Bisher zeigte die Erythropoietin Therapie von ischämischen und neurodegenerativen Erkrankungen keine unerwünschten Nebenwirkungen [42].

Simon konnte 2011 nach Induktion spinaler Ischämien im Schweinemodell zeigen, dass eine Konditionierung mit cEPO-FC und nativem Erythropoietin zu einem besseren histologischen Outcome führt. Periphere Reflexe waren bei beiden Studiengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker erhalten. Das beste Ergebnis der motorisch evozierten Potentiale erzielte die cEPO-FC Gruppe. EPO und cEPO-FC verminderten im Großtierversuch eine spinale Dysfunktion und neuronale Degeneration [135]. Natives Erythropoietin wurde 2002 von Celik im Kaninchenmodell zur Prophylaxe einer spinalen Ischämie nach aortalem Crossclamping getestet. Eine EPO Konditionierung konnte bei einer Klemmzeit

von 20min klinische und histologische Verbesserungen gegenüber der Kontrollgruppe erzielen [25]. Darbepoetin-alpha, ein weiteres Erythropoietinderivat, konnte in einem weiteren Kaninchenmodell ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung erzielen [162].

In unseren Versuchen konnten die cEPO-FC Studiengruppen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen der ersten und zweiten Versuchsdurchführung weder klinische noch histologische Verbesserungen erzielen. Das native Erythropoietin hingegen zeigte insbesondere auf klinischer Ebene neuroprotektive Effekte.

Die Unwirksamkeit des carbamylierten EPO Fusionsproteins kann in diesem Zusammenhang durch drei Theorien erklärt werden:

1. Das cEPO-FC weist eine artenspezifische Wirkung auf.

   Eine neuroprotektive Wirkung des carbamylierten Erythropoietins konnte bisher für Nagetiere [95] und Schweine [135] bestätigt werden. Lapchak konnte 2008 in einem „rabbit small clot embolic stroke model (RSCEM)" belegen, dass eine cEPO Gabe in einem kritischen Zeitfenster von 3h das neurologische Outcome nach Schlaganfall verbessern kann [92].

   Für unsere Versuche verwendeten wir das cEPO-FC Peptid, das im Vergleich zum cEPO Molekül eine unterschiedliche Struktur aufweist. Womöglich verliert das cEPO-FC Molekül beim Kaninchen seine artenspezifische Wirkung.

2. cEPO-FC konnte im Gegensatz zum nativen Erythropoietin die (intakte) Blut-Hirnschranke nicht passieren.

   Hydrophile Substanzen können bei Überschreiten einer kritischen Größe von 600-1000Da (Dalton) die intakte Blut-Hirnschranke nicht überwinden [81]. In der Literatur finden sich bezüglich Liquorgängigkeit für Erythropoietin (30,4kDa) und dem cEPO-FC (112kDa) widersprüchliche Daten. Eine ausschließlich parakrine Wirkungsweise wurde postuliert und angenommen, dass EPO die intakte Blut-Hirnschranke nicht passieren kann [38, 103]. Spätere Studien registrierten nach systemischer EPO Applikation eine erhöhte EPO Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit [41, 44]. Diese Erkenntnis konnte Juul bei Neugeborenen mit neurologischen Erkrankungen nicht reproduzieren. Er fand keine Korrelation zwischen plas-

matischer und zerebrospinaler Erythropoietinkonzentration. Auch nach systemischer Applikation kam es zu keinem Anstieg der EPO Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit [73].

In einer experimentellen Studie untersuchte Banks an Mäusen die Blut-Hirnschrankenpermeabilität dreier Erythropoietinderivate. Nach intravenöser Applikation konnten alle Derivate in der zerebrospinalen Flüssigkeit nachgewiesen werden. Die „blood to brain barrier influx rates“ zeigten Eigenschaften eines extrazellulären Transports und waren nicht sättigbar (charakteristisch für Transportmechanismus) [11]. Andere Arbeitsgruppen konnten EPO-Rezeptor Komponenten im Endothelium der Blut-Hirnschranke nachweisen, was einen rezeptorvermittelten EPO Transport über die Bluthirnschranke vermuten lässt [20, 104].

Inwiefern artenspezifische Unterschiede der Blut-Hirnschranke an einer selektiven Permeabilität von Erythropoietinderivaten beteiligt sind, kann abschließend nicht geklärt werden.

Ob sich das i.v. verabreichte Erythropoietin in der Spinalflüssigkeit anreichert, wurde in unserem Versuchsmodell nicht erfasst. Durch die effektive Konditionierung der EPO Studiengruppe gelang ein indirekter Nachweis, dass natives Erythropoietin beim Kaninchen in der Lage ist die Blut-Hirnschranke zu überwinden.

Ob das cEPO-FC Protein aufgrund einer ungenügenden Bioverfügbarkeit keine neuroprotektive Wirkung erzielen konnte, müsste durch Versuche mit Liqourkonzentrationsbestimmungen endgültig geklärt werden. Möglicherweise kann carbamyliertes Erythropoietin aufgrund der komplexen Peptidstruktur oder eines nicht vorhandenen Transportproteins die Blut-Hirnschranke nicht passieren. In diesem Fall sollten Alternativen zum systemischen Applikationsweg gefunden werden. Intranasale Applikationswege wurden bereits erfolgreich für Eryhtropoietin und EPO Derivate getestet [52, 139]. Carbamyliertes Erythropoietin kann auf diesem Wege über den Bulbus olfactorius das Gehirn erreichen. Fraglich bleibt in diesem Zusammenhang, ob eine ausreichende Diffusion zu ischämischen Strukturen, wie dem Rückenmark, erreicht werden kann. Ebenso stellt der intrathekale Applikationsweg eine klinisch relevante Alternative dar, zumal häufig ein Spi-

nalkatheter vor komplexchirurgischen Eingriffen der Aorta zur Liquordrucksenkung angelegt wird. Hierfür und zur Ermittlung der optimalen Dosierung einer pharmakologischen Konditionierung sind weiterführende Studien nötig.

3. Die Dosierung von cEPO-FC wurde falsch gewählt.

   Die Dosierung der Studienmedikamente betrug 5000IU (~50µg/kg KG) für natives Erythropoietin und 50µg/kg KG für cEPO-FC. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug sowohl vor als auch nach dem aortalen Clamping 0,25ml/kg KG. Die Dosierungen für natives und carbamyliertes Erythropoietin wurden in früheren Tiermodellen bereits erfolgreich angewandt [18, 77, 135, 154]. Beide Studiengruppen erhielten in unseren Versuchen die gleiche Proteinmenge. Unter Berücksichtigung von Molekulargewicht und sterischer Struktur des cEPO-FC Proteins, muss jedoch eine geringe Anzahl an EPO Untereinheiten für die cEPO-FC Gruppe angenommen werden [135].

   In unseren Versuchen war die Dosierung von nativem Erythropoietin richtig gewählt, um neuroprotektive Effekte zu erzielen. Zur Dosierung von carbamyliertem Erythropoietin liegen wenige Daten vor. Unsere gewählte Dosierung für cEPO konnte bereits im Schweine -, Kaninchen -, und Rattenmodell eine neuroprotektive Wirkung erzielen [92, 135, 154].

Die EPO Studiengruppe konnte in der zweiten Versuchsdurchführung bis 36h Nachbeobachtungszeit gegenüber der cEPO-FC Studiengruppe und Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Verbesserung des klinischen Outcomes erreichen. Für die histologischen und übrigen Ergebnisse der klinischen Evaluation zeigte sich ein neuroprotektiver Effekt, welcher statistisch jedoch nicht belegbar war.
Erythropoietinderivate können durch zelluläre Protektionsmechanismen [30, 56, 58, 101, 137] die hypoxieanfälligen anterioren Motoneurone schützen. Inwiefern eine prä - und postoperative EPO Konditionierung über 30min ausreichend ist, um diese Effekte zu erzielen, muss in weiteren Versuchen getestet werden. Der registrierte Wirkungsabfall nach 36h von nativem Erythropoietin wäre durch einen abgefallenen Wirkspiegel erklärbar. Brines hatte in einem Review Artikel über Erythropoietin wichtige Erkenntnisse zur dosisabhängigen Aktivierung des homo-

und heterodimeren EPO Rezeptors zusammengefasst. Durch eine ischämische Stoffwechsellage kommt es zu einer lokalen Expression von EPO und dessen heterodimeren Rezeptors. Erythropoietische Vorläuferzellen exprimieren kontinuierlich eine geringe Anzahl an homodimeren EPO Rezeptoren. Die systemische Mindestdosierung zur Induktion einer Neuroprotektion liegt gemäß den Berechnungen von Brines bei 500IU/kg KG [18].

Der homo - und heterodimere EPO Rezeptor unterscheidet sich hinsichtlich seiner Affinität zum EPO Molekül. Der homodimere EPO-R reagiert mit einer höheren Affinität auf geringere EPO Konzentrationen als die heterodimere Rezeptorform. Der physiologische Wert des zirkulierenden EPOs, welches aus den Nieren zur Aufrechterhaltung der Erythropoese gebildet wird, beträgt 1-7pmol/l [71].

Im Gegensatz zum endokrinen System, mit Konzentrationen im pikomolaren Bereich, wird Erythropoietin auch im ischämischen Gewebe gebildet. Durch die lokale EPO Produktion werden höhere Konzentrationen erzielt (1-20nmol/l). Die Affinität des heterodimeren Rezeptors ist geringer, so dass ischämisches Gewebe auf lokal gebildetes bzw. therapeutisch appliziertes Erythropoietin angewiesen ist [18].

In unseren Versuchen wurde natives Erythropoietin in einer Dosierung von 5000IU/kg KG verabreicht. Die in der Literatur beschriebene Mindestdosierung von 500IU/kg KG zur Induktion neuroprotektiver Wirkungen wurde berücksichtigt [20, 77, 154].

Die Plasmahalbwertszeit von Erythropoietin wird mit 2-13h angegeben [49]. Unter Umständen konnte unsere gewählte Dosierung für bis zu 36h einen effektiven Wirkspiegel aufrechterhalten. Mit zunehmender Metabolisierung des Studienmedikaments kam es zu einem statistisch relevanten Wirkungsverlust. Folglich müsste eine pharmakologische Konditionierung mit Erythropoietin über einen prolongierten Zeitraum fortgeführt werden, um langanhaltende klinische Effekte zu erzielen.

Eine übliche Dosierung von Erythropoietin zur Therapie renaler Anämien ist 100IU/kg Körpergewicht [18]. Bei der von uns gewählten EPO Dosierung muss im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer Stimulation der Erythropoese gerechnet werden. Eine Hämatokritbestimmung am vierten postoperativen Tag wurde in unserem Tiermodell nicht durchgeführt. Ob es durch die beschriebene EPO

Dosierung zu einer Zunahme an unerwünschten Nebenwirkungen kommen würde, müsste durch Langzeitstudien untersucht werden.

Der Pathomechanismus einer spinalen Ischämie - und Reperfusionsschädigung ist nicht endgültig erforscht. Erythropoietin und sein carbamyliertes Derivat können, wie eingangs dargestellt, zytoprotektive Effekte auf ischämisch gefährdete Zellen ausüben [30, 56, 95, 101, 137, 153]. Kawakami konnte 2001 zeigen, dass Erythropoietin in der Zellkultur die Ca^{2+} induzierte Glutamatfreisetzung senkt und auf diese Weise neuroprotektiv wirksam ist [79].

1987 untersuchte Jacobs in einem Kaninchenmodell die pathophysiologischen Abläufe einer ischämischen Rückenmarksschädigung [70]. Nach Okklusion der Aorta wurden klinische, biochemische und histologische Parameter untersucht. Mittels Mikrogravimetrie konnten Erkenntnisse über eine postoperative Ödementwicklung des Rückenmarks gewonnen werden. Ergebnisse der klinischen Nachbeobachtung waren mit dem postoperativen Verlauf unserer Kontrollgruppen weitestgehend identisch. Nach postoperativer Paraplegie entwickelte sich in den ersten Stunden eine rasche Regeneration der motorischen Funktion. Im weiteren Verlauf (nach 12-18h) verschlechterten sich erneut die neurologischen Fähigkeiten. In der Studie von Jacobs korrelierte eine Ödementwicklung der grauen und weißen Substanz zwischen 4-24h mit einem schlechteren klinischen Outcome [70]. Biochemisch konnte im Zuge der Reperfusion eine Erhöhung von Thromboxan A_2 zu Ungunsten von Prostaglandin I_2 festgestellt werden. Dieses Ungleichgewicht führt zu einer Aggregation von Thrombozyten und einer Vasokonstriktion, was eine ischämische Schädigung nachträglich potenzieren kann [61]. Eine Inhibition von Thromboxan sowie Prostaglandin Substitution konnten das ZNS in Ischämieversuchen bereits schützen [61, 70].

Der Wirkungsverlust von nativem Erythropoietin könnte, neben eines unzureichenden Wirkspiegels, auf später einsetzende Komponenten der Reperfusionsphase zurückzuführen sein. So könnte beispielsweise eine Ödementwicklung mit Zunahme des Liquordruckes den neuroprotektiven Effekt von Erythropoietin minimieren. Nach Wiedereintritt der Reperfusion kommt es radiologisch zum Phänomen des „parenchymatösen Enhancements“. Dieses Phänomen (auch „Luxusperfusion“ genannt) ist auf eine Gefäßautoregulationsstörung mit Vasodilatation zurückzuführen. Die Luxusperfusion kann nach ischämi-

schem Insult bis zu 24h andauern und eine Ödementwicklung nach sich ziehen [107]. Erythropoietin konnte in experimentellen Studien die postischämische Vasodilatation reduzieren und einen Reperfusionsschaden minimieren [22, 25, 64]. Eine prolongierte EPO Applikation könnte dementsprechend einen günstigen Einfluss auf die beschriebenen Pathomechanismen der Reperfusionsphase nehmen.

Wie in unseren Versuchen angedeutet, könnte Erythropoietin die Ischämietoleranz erhöhen und somit signifikante Verbesserungen in der frühen Reperfusionsphase erzielen. Eine klinische Regeneration nach postoperativer Plegie wurde in der Kontrollgruppe mit zunehmender Klemmzeit nicht beobachtet. Nach postoperativer Paraplegie wurden in der 22min EPO Studiengruppe annähernd identische Tarlov Werte wie in der 15min Kontrollgruppe beobachtet. Dies könnte auf eine Erhöhung der Ischämietoleranz durch natives Erythropoietin hindeuten. Im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen zeigte ein Tier der EPO Studiengruppe unmittelbar nach Operation keine Paraplegie (Tarlov Wert 4).

Erythropoietin und dessen Rezeptor konnten im menschlichen Gehirn als wichtige Faktoren zur Ausreifung und Entwicklung identifiziert werden [35, 74, 83, 136]. Sowohl Astrozyten als auch Neuronen, zeigten im postnatalen Gehirn eine immunhistochemische Reaktion auf Erythropoietin und dessen Rezeptor [74]. Diese Erkenntnis und die Beobachtung, dass die Expression von EPO und EPO-R unter Hypoxie im menschlichen Gehirn gesteigert wird [39, 133, 136], sprechen für eine speziesübergreifende Wirkeigenschaft von Erythropoietin. Es kann davon ausgegangen werden, dass nach effektiver Prophylaxe einer spinalen Ischämie nach aortalem Crossclamping im Tiermodell auch Menschen von einer EPO Konditionierung profitieren würden.

Durch eine Langzeitapplikation von Erythropoietin tritt eine Hypertonie insbesondere während der ersten vier Monate auf [117]. Experimentelle Studien konnten belegen, dass sowohl chronische als auch einmalige EPO Applikationen zu einem Anstieg des systolischen Blutdruckes führen können [64, 129, 152]. Coleman stellte bereits 10min nach EPO Applikation an Ratten einen Anstieg des carotidalen Blutdruckes fest [31]. Der Akuteffekt von Eryhtropoietin wird mit einer vasokonstriktiven Wirkung auf glatte Muskelzellen erklärt [7, 64, 108, 152]. Carbamyliertes Erythropoietin soll diese Nebenwirkung nicht aufweisen. In ersten

Versuchen zeigte eine cEPO Applikation vielmehr blutdrucksenkende Effekte [31]. In unseren Versuchen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Während der Clampingphase der zweiten Versuchsdurchführung zeigte die cEPO Gruppe statistisch höhere Blutdruckwerte als die Placebogruppe. Natives Erythropoietin neigte während der Declampingphase tendenziell zu niedrigeren systemischen Blutdruckwerten. Ein akuter Blutdruckanstieg unter nativem Erythropoietin konnte nicht beobachtet werden. Da vor Aortenclamping eine pharmakologische Konditionierung über 30min durchgeführt wurde, wäre ein akut blutdrucksteigernder Effekt durch Erythropoietin womöglich innerhalb dieses Zeitintervalls registrierbar gewesen.

4.4 Alternative Strategien zur spinalen Ischämie - und Reperfusionsprophylaxe

Ergänzende Strategien zur Prophylaxe des spinalen Ischämie - und Reperfusionsschadens könnten eine pharmakologische Konditionierung weiter verbessern. Maßnahmen zur Prophylaxe einer Paraplegie nach aortalem Crossclamping werden kontrovers diskutiert [143]:

1. Erhöhung des spinalen Perfusionsdrucks

   Der klinische Benefit einer postoperativen Kontrolle des zerebrospinalen Druckes ist umstritten. Prinzipiell errechnet sich der zerebrale Perfusionsdruck aus der Differenz von mittlerem arteriellen Druck und intrakraniellen Druck. Auf Rückenmarksebene müsste eine Erhöhung des systemischen Blutdruckes oder die Senkung des zerebrospinalen Druckes, beispielsweise durch Liquordrainage, zu einer verbesserten Perfusion führen. Safi und Coselli konnten bereits bei der operativen Versorgung thorakoabdomineller Aortenaneurysmen mittels Liquordrainage die Paraplegieinzidenz senken [32, 126].

2. Lokale Hypothermie

   Eine lokale Hypothermie des Rückenmarks kann durch Minderung der Stoffwechselaktivität die ischämische Toleranz erhöhen [122, 127, 142,

158]. Einige Autoren sprechen von einer linearen Korrelation zwischen Temperatur und spinaler Ischämietoleranz [66]. Eine klinische Effektivität konnte für die lokale (epidurale) [23] und systemische [85] Hypothermie bereits nachgewiesen werden. Aufgrund pulmonologischer und gerinnungsspezifischer Komplikationen sollte diese Möglichkeit nur bei ausgewählten Patienten angewendet werden.

3. Aufrechterhaltung einer distalen Perfusion

   Bei der operativen Versorgung eines thorakoabdominellen Aortenaneurysmas steigt das Paraplegierisiko mit zunehmender Klemmzeit (ab 30min) an [78]. Bypass - und Shuntingverfahren zur distalen Perfusion während des aortalen Crossclampings konnten bisher noch keinen sicheren klinischen Benefit liefern. Eine in diesem Zusammenhang oft erforderliche Heparinisierung ist mit einer erhöhten Inzidenz an postoperativen Blutungskomplikationen verbunden [46].

4. Somatosensorisch und motorisch evozierte Potentiale

   Prinzipiell lässt sich die spinale Funktion einfach mit somatosensorisch und motorisch evozierten Potenzialen beurteilen. Perioperativ sind sie jedoch aufgrund vieler angewandter Narkotika und einer möglichen Hypothermie nur bedingt verwertbar [143]. Die Integrität der Vorderhörner lässt sich durch die Ableitung motorisch evozierter Potentiale überprüfen. Van Dongen ging bei partieller Gasnarkose (Propofol/ Fentanyl + N_2O) von aussagekräftigen Ergebnissen aus [149].

5. Reinseration von Interkostal - und Lumbalarterien

   Safi publizierte 1998, dass die Ligatur von Interkostalgefäßen während der operativen Versorgung thorakoabdomineller Aortenaneurysmen zu einem schlechteren neurologischen Outcome führt [125]. Andere Arbeitsgruppen ziehen ein zügiges Operationsverfahren mit Übernähung der Interkostalgefässe und anschließender Liquordrainage vor [2].

Unsere Arbeit konzentrierte sich auf die Möglichkeit der pharmakologischen Konditionierung. Alternative Strategien wurden in unserem Tiermodell nicht überprüft.

In der Gefäßchirurgie ist aktuell kein Wirkstoff für die Prophylaxe einer spinalen Ischämie nach aortalem Crossclamping zugelassen. Substanzen, die in Zellkulturversuchen neuroprotektive Wirkeigenschaften aufweisen, können im beschriebenen Kaninchenmodell klinisch getestet werden. Natives Erythropoietin konnte in diesem Zusammenhang, insbesondere während der frühen Reperfusionsphase, das klinische Outcome nach Ischämieinduktion signifikant verbessern. Mit zunehmender Dauer der Nachbeobachtung wurde eine Minderung der Effektivität beobachtet. Weitere Studien zur Erprobung alternativer Applikationswege oder Dosierungen sind erforderlich, um einen maximalen protektiven Effekt zu erzielen. Gegebenenfalls könnte eine verlängerte Applikation von Erythropoietin das klinische Outcome auch nach 36h verbessern. Natives Erythropoietin ist in der Klinik zur Therapie chronischer Anämien zugelassen. Relevante Nebenwirkungen, welche insbesondere unter einer Dauertherapie beobachtet wurden, traten während unserer Versuche nicht auf.

Carbamyliertes Erythropoietin konnte entgegen der postulierten Wirkeigenschaften eine spinale Ischämie nicht verhindern.

Ergänzende Maßnahmen könnten die Komplikationsrate weiter senken.

5. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Effektivität und Reproduzierbarkeit des Tiermodells zur Erprobung einer pharmakologischen Konditionierung nach aortalem Crossclamping der infrarenalen Aorta beim Kaninchen.

Die optimale Klemmzeit bei New Zealand White Rabbits zur Induktion einer einheitlichen spinalen Ischämie liegt, trotz der bekannten tierspezifischen Diskrepanz bezüglich des neurologischen Outcomes, bei 22min. Das Kaninchenmodell liefert im Gegensatz zu Terminalversuchen am Großtier wichtige Aussagen zur klinischen Effektivität eines Studienmedikaments. Histologische und klinische Ergebnisse zeigen in diesem Modell eine statistisch signifikante Korrelation.

Natives Erythropoietin kann als Kurzinfusion vor und nach 22min Crossclamping der Aorta beim Kaninchen eine spinale Ischämie reduzieren. Eine Wirksamkeit auf histologischer Ebene konnte statistisch jedoch nicht belegt werden. Das carbamylierte Erythropoietinderivat zeigte keine neuroprotektive Wirkeigenschaft.

Weitere Studien zur optimalen Dosierung, Infusionsdauer und Applikationsart sind nötig, um eine allgemeine Empfehlung im humanen Einsatz auszusprechen. Komplexe gefäßchirurgische Interventionen mit hohem Paraplegierisiko sind auf neuroprotektive Strategien angewiesen. Anerkannte Methoden wie die Hypothermie, die Senkung des zerebrospinalen Druckes oder Erhöhung des mittleren arteriellen Druckes zur Verbesserung der spinalen Perfusion könnten von einer ergänzenden pharmakologischen Konditionierung profitieren.

Die Inzidenz einer postoperativen Querschnittslähmung konnte nach Crossclamping der infrarenalen Aorta beim Kaninchen durch eine Applikation von nativem Erythropoietin reduziert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR: Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. J Neurosci 27: 1129-1138 (2007)

2. Acher CW, Wynn MM, Hoch JR, Popic P, Archibald J, Turnipseed WD: Combined use of cerebral spinal fluid drainage and naloxone reduces the risk of paraplegia in thoracoabdominal aneurysm repair. J Vasc Surg 19: 236-248 (1994)

3. Adam-Vizi V: Neuroprotective effect of sodium channel blockers in ischemia: the pathomechanism of early ischemic dysfunction. Orv Hetil 141: 1279-1286 (2000)

4. Agrawal SK, Fehlings MG: Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na+, Na(+)-K(+)-ATPase, the Na(+)-H+ exchanger, and the Na(+)-Ca2+ exchanger. J Neurosci 16: 545-552 (1996)

5. Ahn S, Min SK, Min SI, Suh JH, Kim SJ, Ha J: Early sustained injections of erythropoietin improve angiogenesis and restoration of perfusion in the ischemic mouse hindlimb. J Korean Med Sci 27: 1073-1078 (2012)

6. Alblas C, Bouvy W, Lycklama G, Boiten J: Acute Spinal-Cord Ischemia: Evolution of MRI Findings. J Clin Neurol 8: 218-223 (2012)

7. Ammarguellat F, Gogusev J, Drueke TB: Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. Nephrol Dial Transplant 11: 687-692 (1996)

8. Arcasoy MO: Non-erythroid effects of erythropoietin. Haematologica 95: 1803-1805 (2010)

9. Artru AA, Katz RA: Cerebral blood volume and CSF pressure following administration of ketamine in dogs; modification by pre- or posttreatment with hypocapnia or diazepam. J Neurosurg Anesthesiol 1: 8-15 (1989)

10. Askitopolou H, Young CA, Morgan M, Sykes MK: Some cardio-pulmonary effects of infra-renal clamping of the abdominal aorta. Anaesth Intensive Care 6: 44-48 (1978)

11. Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC: Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human

and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. Eur J Pharmacol 505: 93-101 (2004)

12. Bardakci H, Kaplan S, Karadeniz U, Ozer C, Bardakci Y, Ozogul C, Birincioglu CL, Cobanoglu A: Methylene blue decreases ischemia-reperfusion (I/R)-induced spinal cord injury: an in vivo study in an I/R rabbit model. Eur Surg Res 38: 482-488 (2006)

13. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J Neurochem 43: 1369-1374 (1984)

14. Berguer R, Porto J, Fedoronko B, Dragovic L: Selective deep hypothermia of the spinal cord prevents paraplegia after aortic cross-clamping in the dog model. J Vasc Surg 15: 62-72 (1992)

15. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E: A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 19: 643-651 (1999)

16. Berry AJ, Smith RB, 3rd, Weintraub WS, Chaikof EL, Dodson TF, Lumsden AB, Salam AA, Weiss V, Konigsberg S: Age versus comorbidities as risk factors for complications after elective abdominal aortic reconstructive surgery. J Vasc Surg 33: 345-352 (2001)

17. Blankensteijn JD, Lindenburg FP, Van der Graaf Y, Eikelboom BC: Influence of study design on reported mortality and morbidity rates after abdominal aortic aneurysm repair. Br J Surg 85: 1624-1630 (1998)

18. Brines M, Cerami A: Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. J Intern Med 264: 405-432 (2008)

19. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, Latini R, Xie QW, Smart J, Su-Rick CJ, Pobre E, Diaz D, Gomez D, Hand C, Coleman T, Cerami A: Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. Proc Natl Acad Sci USA 101: 14907-14912 (2004)

20. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A: Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA 97: 10526-10531 (2000)

21. Brown LC, Powell JT: Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. Ann Surg 230: 289-297 (1999)

22. Buemi M, Allegra A, Lagana A, Aloisi C, Morabito N, Baldari S, Privitera M, Palella S, Imbesi D, Villari C, et al.: Is erythropoietin-induced hypertension a phenomenon due to the intracellular Ca++ mobilisation? Int Angiol 13: 75-77 (1994)

23. Cambria RP, Davison JK, Carter C, Brewster DC, Chang Y, Clark KA, Atamian S: Epidural cooling for spinal cord protection during thoracoabdominal aneurysm repair: A five-year experience. J Vasc Surg 31: 1093-1102 (2000)

24. Carroll GL, Hartsfield SM: General anesthetic techniques in ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract 12: 627-661 (1996)

25. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M: Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2258-2263 (2002)

26. Choi DW: Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. J Neurosci 10: 2493-2501 (1990)

27. Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1: 623-634 (1988)

28. Choi DW: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. Neurosci Lett 58: 293-297 (1985)

29. Choi DW: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7: 369-379 (1987)

30. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K: Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. Br J Pharmacol 138: 1107-1118 (2003)

31. Coleman TR WC, Tögel FE, Yang Y, Hu Z, Swenson L, Leuvenink HG, Ploeg RJ, d'Uscio LV, Katusic ZS, Ghezzi P, Zanetti A, Kaushansky K, Fox NE, Cerami A, Brines M: Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. Proc Natl Acad Sci USA 103: 5965-5970 (2006)

32. Coselli JS, LeMaire SA, Koksoy C, Schmittling ZC, Curling PE: Cerebrospinal fluid drainage reduces paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: results of a randomized clinical trial. J Vasc Surg 35: 631-639 (2002)

33. Crawford ES, Svensson LG, Hess KR, Shenaq SS, Coselli JS, Safi HJ, Mohindra PK, Rivera V: A prospective randomized study of cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia after high-risk surgery on the thoracoabdominal aorta. J Vasc Surg 13: 36-46 (1991)

34. Cronenwett JL, Lindenauer SM: Distribution of intrarenal blood flow following aortic clamping and declamping. J Surg Res 22: 469-482 (1977)

35. Dame C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J: Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. Brain Res Dev Brain Res 125: 69-74 (2000)

36. Dame C, Juul SE, Christensen RD: The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. Biol Neonate 79: 228-235 (2001)

37. Detsch O, Kochs E: Effekte von Ketamin auf die ZNS-Funktion. Anaesthesist 46 Suppl 1: 20-29 (1997)

38. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M: Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3717-3720 (1995)

39. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM: Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. Trends Neurosci 26: 248-254 (2003)

40. Dittmar MS, Fehm NP, Vatankhah B, Horn M: Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications. Comp Med 54: 652-655 (2004)

41. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, Ruther E, Cerami A, Becker W, Siren AL: Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. Mol Psychiatry 9: 42-54 (2004)

42. Eid T, Brines M: Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence? Clin Breast Cancer 3 Suppl 3: S109-115 (2002)

43. Eklof B, Neglen P, Thomson D: Temporary incomplete ischemia of the legs induced by aortic clamping in man: effects on central hemodynamics and skeletal muscle metabolism by adrenergic block. Ann Surg 193: 89-98 (1981)

44. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, Brines M: Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. Curr Hematol Rep 2: 465-470 (2003)

45. Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M: Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing. Mol Med 15: 235-241 (2009)

46. Ergin MA, Galla JD, Lansman SL, Taylor M, Griepp RB: Distal perfusion methods for surgery of the descending aorta. Semin Thorac Cardiovasc Surg 3: 293-299 (1991)

47. Falk JL, Rackow EC, Blumenberg R, Gelfand M, Fein IA: Hemodynamic and metabolic effects of abdominal aortic crossclamping. Am J Surg 142: 174-177 (1981)

48. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R: A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci USA 102: 2046-2051 (2005)

49. Foley RN: Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. Heart Fail Rev 13: 405-414 (2008)

50. Follis F, Scremin OU, Blisard KS, Scremin AM, Pett SB, Scott WJ, Kessler RM, Wernly JA: Selective vulnerability of white matter during spinal cord ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 13: 170-178 (1993)

51. Fry WJ, Keitzer WF, Kraft RO, De Weese MS: Prevention of hypotension due to aortic release. Surg Gynecol Obstet 116: 301-306 (1963)

52. Garcia-Rodriguez JC, Sosa-Teste I: The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. ScientificWorldJournal 9: 970-981 (2009)

53. Gardner AE, Dannemiller FJ, Dean D: Intracranial cerebrospinal fluid pressure in man during ketamine anesthesia. Anesth Analg 51: 741-745 (1972)

54. Gawenda M ZM, Görg C, Südkamp M, Haupt W, Koebke J, Brunkwall J Das Dilemma der spinalen Ischämie: Interdisziplinäre Strategien zum Schutz vor spinaler Ischämie bei Aortenchirurgie. Dtsch Arztebl: 102: A-3038 (2005)

55. Gelman S: The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. Anesthesiology 82: 1026-1060 (1995)

56. Genc S, Koroglu TF, Genc K: Erythropoietin as a novel neuroprotectant. Restor Neurol Neurosci 22: 105-119 (2004)

57. Gharagozloo F, Neville RF, Jr., Cox JL: Spinal cord protection during surgical procedures on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: a critical overview. Semin Thorac Cardiovasc Surg 10: 73-86 (1998)

58. Ghezzi P, Brines M: Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. Cell Death Differ 11 Suppl 1: 37-44 (2004)

59. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD: Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. J Neurochem 51: 1455-1464 (1988)

60. Grubbs PE, Jr., Marini C, Toporoff B, Nathan I, Basu S, Acinapura AJ, Cunningham JN, Jr.: Somatosensory evoked potentials and spinal cord perfusion pressure are significant predictors of postoperative neurologic dysfunction. Surgery 104: 216-223 (1988)

61. Hallenbeck JM, Furlow TW, Jr.: Prostaglandin I2 and indomethacin prevent impairment of post-ischemic brain reperfusion in the dog. Stroke 10: 629-637 (1979)

62. Hashizume K, Ueda T, Shimizu H, Mori A, Yozu R: Effect of the free radical scavenger MCI-186 on spinal cord reperfusion after transient ischemia in the rabbit. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg 53: 426-433 (2005)

63. Hatori N, Yoshizu H, Shimizu M, Hinokiyama K, Takeshima S, Kimura T, Iizuka Y, Tanaka S: Prognostic factors in the surgical treatment of ruptured abdominal aortic aneurysms. Surg Today 30: 785-790 (2000)

64. Heidenreich S, Rahn KH, Zidek W: Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. Kidney Int 39: 259-265 (1991)

65. Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H: Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 362: 1255-1260 (2003)

66. Hollier LH: Protecting the brain and spinal cord. J Vasc Surg 5: 524-528 (1987)

67. Huber TS, Wang JG, Derrow AE, Dame DA, Ozaki CK, Zelenock GB, Flynn TC, Seeger JM: Experience in the United States with intact abdominal aortic aneurysm repair. J Vasc Surg 33: 304-311 (2001)

68. Ifudu O, Dawood M, Homel P: Erythropoietin-induced elevation in blood pressure is immediate and dose dependent. Nephron 79: 486-487 (1998)

69. Jacobs TP, Kempski O, McKinley D, Dutka AJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G: Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia. Stroke 23: 367-373 (1992)

70. Jacobs TP, Shohami E, Baze W, Burgard E, Gunderson C, Hallenbeck JM, Feuerstein G: Deteriorating stroke model: histopathology, edema, and eicosanoid changes following spinal cord ischemia in rabbits. Stroke 18: 741-750 (1987)

71. Jelkmann W: Erythropoietin after a century of research: younger than ever. Eur J Haematol 78: 183-205 (2007)

72. Jeroen L, Peter de H, Steven WdJ, Ivo V, Michael JJ, Cor JK: The role of transcranial motor evoked potentials in predicting neurologic and histopathologic outcome after experimental spinal cord ischemia. Anesthesiology 97: 183-191 (2002)

73. Juul SE, Stallings SA, Christensen RD: Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury. Pediatr Res 46: 543-547 (1999)

74. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD: Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. Pediatr Dev Pathol 2: 148-158 (1999)

75. Kakinohana M, Kawabata T, Miyata Y, Sugahara K: Myogenic transcranial motor evoked potentials monitoring cannot always predict neurologic outcome after spinal cord ischemia in rats. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 129: 46-52 (2005)

76. Kanellopoulos GK, Xu XM, Hsu CY, Lu X, Sundt TM, Kouchoukos NT: White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. Stroke 31: 1945-1952 (2000)

77. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E: Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: ef-

fect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. Neurosurg Rev 27: 113-120 (2004)

78. Katz NM, Blackstone EH, Kirklin JW, Karp RB: Incremental risk factors for spinal cord injury following operation for acute traumatic aortic transection. J Thorac Cardiovasc Surg 81: 669-674 (1981)

79. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M: Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. J Biol Chem 276: 39469-39475 (2001)

80. Kesherwani V, Agrawal SK: Regulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (IP3R1) in hypoxic/reperfusion injury of white matter. Neurol Res 34: 504-511 (2012)

81. Kilic E, Dietz GP, Hermann DM, Bahr M: Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. Ann Neurol 52: 617-622 (2002)

82. Kiyoshima T, Fukuda S, Matsumoto M, Iida Y, Oka S, Nakakimura K, Sakabe T: Lack of evidence for apoptosis as a cause of delayed onset paraplegia after spinal cord ischemia in rabbits. Anesth Analg 96: 839-846 (2003)

83. Knabe W, Knerlich F, Washausen S, Kietzmann T, Siren AL, Brunnett G, Kuhn HJ, Ehrenreich H: Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. Anat Embryol (Berl) 207: 503-512 (2004)

84. Korkmaz A, Oyar EO, Kardes O, Omeroglu S: Effects of melatonin on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross clamping in rabbits. Curr Neurovasc Res 5: 46-51 (2008)

85. Kouchoukos NT, Masetti P, Rokkas CK, Murphy SF, Blackstone EH: Safety and efficacy of hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest for operations on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta. Ann Thorac Surg 72: 699-708 (2001)

86. Kugler J, Doenicke A: Ketamin-antikonvulsive und prokonvulsive Wirkungen. Anaesthesist 43 Suppl 2: 2-7 (1994)

87. Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M: Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. Free Radic Res 29: 93-101 (1998)

88. Kurita N, Kawaguchi M, Horiuchi T, Inoue S, Sakamoto T, Nakamura M, Konishi N, Furuya H: An evaluation of white matter injury after spinal cord is-

chemia in rats: a comparison with gray matter injury. Anesth Analg 100: 847-854 (2005)

89. Kurita N, Kawaguchi M, Kakimoto M, Yamamoto Y, Inoue S, Nakamura M, Konishi N, Patel PM, Furuya H: Reevaluation of gray and white matter injury after spinal cord ischemia in rabbits. Anesthesiology 105: 305-312 (2006)

90. Lafci B, Yasa H, Ilhan G, Ortac R, Yilik L, Kestelli M, Goktogan T, Gurbuz A: Protection of the spinal cord from ischemia: comparative effects of levosimendan and iloprost. Eur Surg Res 41: 1-7 (2008)

91. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Vaillant N, Widmann C, Lazdunski M: Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. J Thorac Cardiovasc Surg 117: 881-889 (1999)

92. Lapchak PA, Kirkeby A, Zivin JA, Sager TN: Therapeutic window for nonerythropoietic carbamylated-erythropoietin to improve motor function following multiple infarct ischemic strokes in New Zealand white rabbits. Brain Research 1238: 208-214 (2008)

93. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG: The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. Arch Intern Med 160: 1425-1430 (2000)

94. Lee JC, Hwang IK, Park SK, Yoo KY, Seo K, Kang TC, Oh YS, Won MH: Histochemical and electron microscopic study on motor neurone degeneration following transient spinal cord ischaemia at normothermic conditions in rabbits. Anat Histol Embryol 34: 252-257 (2005)

95. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M: Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 305: 239-242 (2004)

96. Levin A: The cardiovascular effects of aortic clamping and unclamping. Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia 16: 62-71 (2010)

97. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E: Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast

cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. J Clin Oncol 23: 5960-5972 (2005)

98. Lim RC, Jr., Bergentz SE, Lewis DH: Metabolic and tissue blood flow changes resulting from aortic cross-clamping. Surgery 65: 304-310 (1969)

99. Lipton P: Ischemic Cell Death in Brain Neurons. Physiological Reviews 79: 1431-1568 (1999)

100. Lucas DR, Newhouse JP: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. AMA Arch Ophthalmol 58: 193-201 (1957)

101. Maiese K, Li F, Chong ZZ: Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 25: 577-583 (2004)

102. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C: Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. Physiology 15: 225-229 (2000)

103. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C: Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. Kidney Int 51: 416-418 (1997)

104. Martinez-Estrada OM, Rodriguez-Millan E, Gonzalez-De Vicente E, Reina M, Vilaro S, Fabre M: Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. Eur J Neurosci 18: 2538-2544 (2003)

105. Money SR, Hollier LH: The management of thoracoabdominal aneurysms. Adv Surg 27: 285-294 (1994)

106. Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott SJ, Lakatta EG, Talan MI: Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. J Pharmacol Exp Ther 316: 999-1005 (2006)

107. Mullins ME, Schaefer PW, Sorensen AG, Halpern EF, Ay H, He J, Koroshetz WJ, Gonzalez RG: CT and conventional and diffusion-weighted MR imaging in acute stroke: study in 691 patients at presentation to the emergency department. Radiology 224: 353-360 (2002)

108. Neusser M, Tepel M, Zidek W: Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res 27: 1233-1236 (1993)

109. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y: Role of erythropoietin in the brain. Crit Rev Oncol Hematol 64: 159-171 (2007)

110. Olney JW: Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science 164: 719-721 (1969)

111. Orend KH, Liewald F, Kirchdorfer B, Sunder-Plassmann L: Management of descending aortic dissection. Ann Ital Chir 66: 821-824 (1995)

112. Oz Oyar E, Kardes O, Korkmaz A, Omeroglu S: Effects of vascular endothelial growth factor on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross-clamping in rabbits. J Surg Res 151: 94-99 (2009)

113. Oz Oyar E, Korkmaz A, Kardess O, Omeroglu S: Aortic cross-clamping-induced spinal cord oxidative stress in rabbits: the role of a novel antioxidant adrenomedullin. J Surg Res 147: 143-147 (2008)

114. Perry MO: The hemodynamics of temporary abdominal aortic occlusion. Ann Surg 168: 193-200 (1968)

115. Pfeilschifter J, Huwiler A: Erythropoietin is more than just a promoter of erythropoiesis. J Am Soc Nephrol 15: 2240-2241 (2004)

116. Qayumi AK, Janusz MT, Dorovini-Zis K, Lyster DM, Jamieson WR, Poostizadeh A, Feeley EJ, Nikbakht-Sangari M: Additive effect of allopurinol and deferoxamine in the prevention of spinal cord injury caused by aortic crossclamping. J Thorac Cardiovasc Surg 107: 1203-1209 (1994)

117. Raine AE, Roger SD: Effects of erythropoietin on blood pressure. Am J Kidney Dis 18: 76-83 (1991)

118. Ribatti D: Angiogenic effects of erythropoietin. Int Rev Cell Mol Biol 299: 199-234 (2012)

119. Ringel F, Chang RC, Staub F, Baethmann A, Plesnila N: Contribution of anion transporters to the acidosis-induced swelling and intracellular acidification of glial cells. J Neurochem 75: 125-132 (2000)

120. Ringer SK, Schwarzwald CC, Portier KG, Ritter A, Bettschart-Wolfensberger R: Effects on cardiopulmonary function and oxygen delivery of doses of romifidine and xylazine followed by constant rate infusions in standing horses. Vet J 195: 228-234 (2012)

121. Roizen MF, Beaupre PN, Alpert RA, Kremer P, Cahalan MK, Shiller N, Sohn YJ, Cronnelly R, Lurz FW, Ehrenfeld WK, et al.: Monitoring with two-dimensional transesophageal echocardiography. Comparison of myocardial function in patients undergoing supraceliac, suprarenal-infraceliac, or infrarenal aortic occlusion. J Vasc Surg 1: 300-305 (1984)

122. Rokkas CK, Sundaresan S, Shuman TA, Palazzo RS, Nitta T, Despotis GJ, Burns TC, Wareing TH, Kouchoukos NT: Profound systemic hypothermia protects the spinal cord in a primate model of spinal cord ischemia. J Thorac Cardiovasc Surg 106: 1024-1035 (1993)

123. Roques X, Remes J, Laborde MN, Guibaud JP, Rosato F, MacBride T, Baudet E: Surgery of chronic traumatic aneurysm of the aortic isthmus: benefit of direct suture. Eur J Cardiothorac Surg 23: 46-49 (2003)

124. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R: Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. Biochem Biophys Res Commun 253: 26-32 (1998)

125. Safi HJ, Miller CC, 3rd, Carr C, Iliopoulos DC, Dorsay DA, Baldwin JC: Importance of intercostal artery reattachment during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. J Vasc Surg 27: 58-68 (1998)

126. Safi HJ, Miller CC, 3rd, Huynh TT, Estrera AL, Porat EE, Winnerkvist AN, Allen BS, Hassoun HT, Moore FA: Distal aortic perfusion and cerebrospinal fluid drainage for thoracoabdominal and descending thoracic aortic repair: ten years of organ protection. Ann Surg 238: 372-381 (2003)

127. Saito T, Saito S, Yamamoto H, Tsuchida M: Neuroprotection following mild hypothermia after spinal cord ischemia in rats. J Vasc Surg 57: 173-181 (2013)

128. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K: Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. Brain Res 797: 23-28 (1998)

129. Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z: Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. Laryngoscope 113: 85-89 (2003)

130. Scharrer-Pamler R, Kapfer X, Orend KH, Sunder-Plassmann L: Endoluminal grafting of infrarenal aortic aneurysms. Thorac Cardiovasc Surg 47: 119-121 (1999)

131. Schneider H: Kreislaufstörungen und Gefäßprozesse des Rückenmarks. In: Doerr W, Seifert, G, Uehlinger, E (Hrsg) Spezielle pathologische Anatomie, Bd 13/1, 1. Aufl, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 511 - 649 (1980)

132. Schriebl K, Trummer E, Lattenmayer C, Weik R, Kunert R, Muller D, Katinger H, Vorauer-Uhl K: Biochemical characterization of rhEpo-Fc fusion protein expressed in CHO cells. Protein Expr Purif 49: 265-275 (2006)

133. Sharp FR, Bernaudin M: HIF1 and oxygen sensing in the brain. Nat Rev Neurosci 5: 437-448 (2004)

134. Simon F, Scheuerle A, Calzia E, Bassi G, Oter S, Duy CN, Kick J, Bruckner UB, Radermacher P, Schelzig H: Erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced ischemia/reperfusion injury. Crit Care Med 36: 2143-2150 (2008)

135. Simon F, Scheuerle A, Groger M, Vcelar B, McCook O, Moller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H: Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. Intensive Care Med 37: 1525-1533 (2011)

136. Siren AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H: Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. Neurotherapeutics 6: 108-127 (2009)

137. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P: Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc Natl Acad Sci USA 98: 4044-4049 (2001)

138. Smiler KL, Stein S, Hrapkiewicz KL, Hiben JR: Tissue response to intramuscular and intraperitoneal injections of ketamine and xylazine in rats. Lab Anim Sci 40: 60-64 (1990)

139. Sosa I, Cruz J, Santana J, Mengana Y, Garcia-Salman JD, Munoz A, Ozuna TG, Garcia JC: Recombinant human erythropoietin with low sialic acid pathway to the central nervous system by intranasal route in meriones unguiculatus and no human primate macaca fascicularis models. Revista de Salud Animal 30: 39-44 (2008)

140. Svensson LG: New and future approaches for spinal cord protection. Semin Thorac Cardiovasc Surg 9: 206-221 (1997)

141. Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. J Vasc Surg 17: 357-370 (1993)

142. Svensson LG, Khitin L, Nadolny EM, Kimmel WA: Systemic temperature and paralysis after thoracoabdominal and descending aortic operations. Arch Surg 138: 175-180 (2003)

143. Tabayashi K: Spinal cord protection during thoracoabdominal aneurysm repair. Surg Today 35: 1-6 (2005)

144. Tarlov IM: Acute spinal cord compression paralysis. J Neurosurg 36: 10-20 (1972)

145. Thiere M SF, Erhart P, Orend KH, Schelzig H, Oberhuber A: Präklinisches Kleintiermodell zur Erforschung von Ischämie- und Reperfusionsschäden des Rückenmarks nach Crossclamping der Aorta. Gefäßchirurgie 15: 463-467 (2010)

146. Tobu M, Iqbal O, Fareed D, Chatha M, Hoppensteadt D, Bansal V, Fareed J: Erythropoietin-induced thrombosis as a result of increased inflammation and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor. Clin Appl Thromb Hemost 10: 225-232 (2004)

147. Unger EF, Thompson AM, Blank MJ, Temple R: Erythropoiesis-Stimulating Agents - Time for a Reevaluation. New England Journal of Medicine 362: 189-192 (2010)

148. Valeriani V, Dewar D, McCulloch J: Quantitative assessment of ischemic pathology in axons, oligodendrocytes, and neurons: attenuation of damage after transient ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 20: 765-771 (2000)

149. van Dongen EP, ter Beek HT, Schepens MA, Morshuis WJ, Langemeijer HJ, Kalkman CJ, Boezeman EH: The influence of nitrous oxide to supplement fentanyl/low-dose propofol anesthesia on transcranial myogenic motor-evoked potentials during thoracic aortic surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 13: 30-34 (1999)

150. Vardulaki KA, Prevost TC, Walker NM, Day NE, Wilmink AB, Quick CR, Ashton HA, Scott RA: Growth rates and risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. Br J Surg 85: 1674-1680 (1998)

151. Vaziri ND: Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. Am J Kidney Dis 33: 821-828 (1999)

152. Vaziri ND, Zhou XJ, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RE: In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. Am J Physiol 269: F838-845 (1995)

153. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P: Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. J Exp Med 198: 971-975 (2003)

154. Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M, Ghezzi P, Torup L: Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. J Cereb Blood Flow Metab 27: 552-563 (2007)

155. Wahlberg E, Dimuzio PJ, Stoney RJ: Aortic clamping during elective operations for infrarenal disease: The influence of clamping time on renal function. J Vasc Surg 36: 13-18 (2002)

156. Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Satoh M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H: Neuroprotective effect of erythropoietin, and role of metallothionein-1 and -2, in permanent focal cerebral ischemia. Neuroscience 148: 105-114 (2007)

157. Walther A, Bardenheuer HJ: The abdominal aortic aneurysm. Anesthesiologic considerations and perioperative management in conservative surgical treatment. Anaesthesist 49: 690-703 (2000)

158. Wang LM, Yan Y, Zou LJ, Jing NH, Xu ZY: Moderate hypothermia prevents neural cell apoptosis following spinal cord ischemia in rabbits. Cell Res 15: 387-393 (2005)

159. Weilinger NL, Maslieieva V, Bialecki J, Sridharan SS, Tang PL, Thompson RJ: Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. Acta Pharmacol Sin 34: 39-48 (2013)

160. Whalley DG, Salevsky FC, Ryckman JV: Haemodynamic and metabolic consequences of aortic occlusion during abdominal aortic surgery. Br J Anaesth 70: 96-98 (1993)

161. Xu J, Beckman JS, Hogan EL, Hsu CY: Xanthine oxidase in experimental spinal cord injury. J Neurotrauma 8: 11-18 (1991)

162. Yilmaz ER, Kertmen H, Dolgun H, Gurer B, Sanli AM, Kanat MA, Arikok AT, Bahsi SY, Erguder BI, Sekerci Z: Effects of darbepoetin-alpha in spinal cord ischemia-reperfusion injury in the rabbit. Acta Neurochir (Wien) 154: 1037-1044 (2012)

163. Yu QJ, Zhou QS, Huang HB, Wan YL, Tian SF, Duan DM: Effects of ketamine on the balance of ions Ca2+, Mg2+, Cu2+ and Zn2+ in the ischemia-

reperfusion affected spinal cord tissues in rabbits. Neurochem Res 34: 2192-2196 (2009)

164. Yu QJ, Zhou QS, Huang HB, Wang YL, Tian SF, Duan DM: Protective effect of ketamine on ischemic spinal cord injury in rabbits. Ann Vasc Surg 22: 432-439 (2008)

165. Zhang Z, Nonaka H, Nagayama T, Hatori T, Ihara F, Zhang L, Akima M: Circulatory disturbance of rat spinal cord induced by occluding ligation of the dorsal spinal vein. Acta Neuropathol 102: 335-338 (2001)

166. Zivin JA, DeGirolami U: Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. Stroke 11: 200-202 (1980)

167. Zvara DA: Thoracoabdominal aneurysm surgery and the risk of paraplegia: contemporary practice and future directions. J Extra Corpor Technol 34: 11-17 (2002)

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. F. Simon, Herrn Dr. med. A. Oberhuber und Herrn Prof. Dr. med. H. Schelzig für eine hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit.
Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. med. A. Scheuerle für die Hilfestellung bei der histologischen Auswertung.
Schließlich danke ich meiner Familie und Freundin.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.