



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 60 2004 010 691 T2 2008.12.04

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 670 489 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 60 2004 010 691.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB2004/004298

(96) Europäisches Aktenzeichen: 04 768 829.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2005/034966

(86) PCT-Anmeldetag: 11.10.2004

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 21.04.2005

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.06.2006

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 12.12.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.12.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 33/00 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0323861            10.10.2003    GB  
0418539            19.08.2004    GB

(73) Patentinhaber:

Protexeon Ltd., London, GB

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR

(72) Erfinder:

FRANKS, Nicholas Peter, London SW7 2BZ, GB;  
MAZE, Mervyn, London SW10 9NH, GB

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON XENON MIT HYPOTERMIE ZUR BEHANDLUNG VON NEUGEBORENEN-ASPHYXIE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die neonatale (oder perinatale) Asphyxie, auch bekannt als Hypoxie-Ischämie (HI), ist ein Zustand, der aus der unzureichenden Sauerstoffaufnahme bei einem Kind während der Wehen, bei der Entbindung oder in der unmittelbar postnatalen Zeitspanne entsteht. Neonatale Asphyxie bleibt ein Hauptgrund chronischer neurologischer Morbidität sowie akuter Mortalität bei Neugeborenen (Balduini et al, 2000; Vannucci et al, 1997), wobei sie gewöhnlich zu hypoxischischämischer Enzephalopathie führt.

**[0002]** Studien haben gezeigt, dass neonatale Asphyxie (Hypoxie) für eine Zeitspanne von nur sechs Minuten zu anhaltender neurologischer Schädigung führen kann. Der Verlust von Hirngewebe ist bei von Erstickung betroffenen Neugeborenen Primaten gezeigt worden und korreliert mit Gedächtnisfehlfunktion und spastischer Lähmung (Windle, WF, 1969).

**[0003]** Etwa 14,6% aller Todesfälle bei der Geburt werden durch neonatale Asphyxie verursacht. In der westlichen Welt leiden etwa 0,9% (d. h. 100.000 bis 130.000) Neugeborene an neonataler Asphyxie. Etwa 15–20% davon sterben, und von den Überlebenden sind 25% schwer behindert, durch Langzeitkomplikationen, wie etwa mentale Retardierung, cerebrale Lähmung, Spastizität, Lernschwierigkeiten und/oder Epilepsie (Law et al, 1993; Perlman et al, 1999). Weiterhin wird zunehmend festgestellt, dass Kinder mit relativ milder Asphyxie, die sich zunächst ohne Komplikationen zu erholen scheinen, Verhaltensprobleme in der Kindheit zeigen, die sich auf diese neonatale Schädigung zurückführen lassen. Neonatale Asphyxie erfüllt die Kriterien für eine „Orphan Drug“-Indikation, da sie weniger als 5 Patienten von 10.000 Einwohnern betrifft, und sie ist eine lebensbedrohende, zu schwerwiegender geistiger Behinderung führende Erkrankung ohne eine etablierte Therapie.

**[0004]** Es ist in neonatalen Tiermodellen von HI gezeigt worden, dass die Mechanismen des Zelltods, die bei diesem Typ von Hirnschädigung beteiligt sind, eine Kombination exzitotoxischer Schädigung (oder Nekrose), verursacht durch die exzessive Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren, insbesondere von N-Methyl-D-aspartat-(NMDA)-Rezeptoren (da diese Rezeptoren während Phasen der Synaptogenese am empfindlichsten gegenüber Neurotoxizität sind (Jevtovic-Todorovic und Olney, 2003)), und apoptotischer Neurodegeneration (Ikonomidou et al, 1989; Pohl et al, 1999) beinhalten. Dieser Typ von Schädigung steht in Zusammenhang mit dem Schweregrad des hypoxischen Krankheitsergebnisses (Jevtovic-Todorovic und Olney, 2003), sowie außerdem mit Unterschieden bei der Verletzlichkeit der verschiedenen

Hirnregionen (Northington et al, 2001). Derzeit existiert keine wirksame Therapie, um den akuten neuroalen Zelltod, der durch HI verursacht wird, zu bekämpfen, obwohl sich eine Vielzahl sowohl pharmakologischer als auch nicht-pharmakologischer Interventionen in experimenteller Untersuchung befindet (Vannucci und Perlman, 1997).

**[0005]** Die vorliegende Erfindung versucht, eine Behandlung für neonatale Asphyxie bereitzustellen.

**DARSTELLUNG DER ERFINDUNG**

**[0006]** Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung neonataler Asphyxie, wobei dieses Medikament für die Verwendung in Kombination mit Hypothermie bestimmt ist.

**[0007]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem Säugling, der dies benötigt, wobei man:

- (a) eine therapeutisch wirksame Menge an Xenon an den Säugling verabreicht, und
- (b) den Säugling der Hypothermie unterzieht.

**[0008]** Ein dritter Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem Säugling, der dies benötigt, durch Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge an Xenon an den Säugling in Kombination mit Hypothermie.

**[0009]** Ein vierter Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neonataler Asphyxie, wobei es die Behandlung umfasst, einem Subjekt simultan, sequentiell oder getrennt Xenon in Kombination mit Hypothermie zu verabreichen.

**[0010]** Ein fünfter Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von Xenon in Kombination mit Hypothermie für die Behandlung neonataler Asphyxie.

**DETAILLIERTE BESCHREIBUNG****Normale Physiologie des unreifen ZNS**

**[0011]** Die exzitatorischen (erregenden) Aminosäuren (EAAs) Glutamat und Aspartat sind die Hauptmediatoren der exzitatorischen synaptischen Transmission im reifen Zentralnervensystem (ZNS) (Dingledine und McBain, 1999). Sie spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Ontogenie des unreifen ZNS, wo sie an einer Anzahl physiologischer Prozesse, wie etwa Synaptogenese, neuronales Überleben, synaptische Plastizität und dendritische und axonale Struktur, beteiligt sind. Jedoch kann eine exzessive Aktivierung dieser Aminosäurerezeptoren während der Entwicklung neuronale Verletzung und Tod hervorrufen. Dies wird als „Exzitotoxizität“ bezeichnet.

**[0012]** Glutamat ist die häufigste der EAAs (Dingledine und McBain, 1999). Es wird in synaptischen Vesikeln gespeichert und bewirkt eine Calcium-abhängige Membran-Depolarisation postsynaptischer Membranen, wenn es aus den präsynaptischen Enden freigesetzt wird. Glutamat übt seine exzitatorische Wirkung auf eine Vielzahl von Rezeptor-Subtypen aus, die in den N-Methyl-D-aspartat-(NMDA)-Typ und Nicht-NMDA-Typen unterteilt werden können, wobei es im sich entwickelnden ZNS jedoch der NMDA-Rezeptorsubtyp ist, für den herausgefunden wurde, dass er die Hauptrolle bei der mit HI assoziierten Hirnverletzung spielt (Ikonomidou et al, 1989; Komuro, 1993; MacDonald et al, 1986).

**[0013]** Der NMDA-Rezeptor stellt eine Hauptklasse des Glutamatrezeptors dar, und man nimmt an, dass Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugern ist. Wichtiger Weise ist für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors gezeigt worden, dass sie das zentrale Ereignis ist, das zu Exzitotoxizität und neuronalem Tod bei vielen Krankheitszuständen führt, und ebenso ein Ergebnis von Hypoxie und Ischämie nach Kopftauma, Schlaganfall und Herzstillstand.

**[0014]** Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor, der sich ubiquitär im ZNS findet, positioniert auf der Oberfläche sowohl postsynaptischer als auch extrasynaptischer Membranen (Riccio und Ginty, 2002; Sattler et al, 2000). Er ist mit einem kationischen Kanal gekoppelt, der sowohl für  $\text{Na}^+$ - als auch für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchlässig ist, und unter normalen physiologischen Bedingungen wird er bei einem negativen Ruhepotential der Membran durch  $\text{Mg}^{2+}$  blockiert. Diese Blockierung wird bei einer Depolarisation der Zellmembran aufgehoben, was somit den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den Kanal erlaubt und es dem Rezeptor ermöglicht, seine intrazellulären Wirkungen auszuüben (Hardingham und Bading, 2003).

**[0015]** NMDA-Rezeptoren sind entscheidend wichtig für die normale Gehirnfunktion, und ihre Wichtigkeit in der normalen Physiologie wird durch ihre zentrale Rolle beim Lernen und Gedächtnis gezeigt (Bliss und Collingridge, 1993). Demgegenüber ist die pathologische Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch im Überschuss vorliegendes Glutamat die Hauptursache von neuronalem Zelltod nach einem ischämischen Krankheitsergebnis am Gehirn, aufgrund der Zerstörung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation. Dies betont die zentrale Rolle, die NMDA-Rezeptoren bei HI spielen.

Hypoxisch-ischämische Verletzung beim Neugeborenen

**[0016]** Damit das Gehirn funktionieren kann, benötigt es eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Glukose und ist somit abhängig von einer ange-

messenen Blutzufuhr (Choi und Rothman, 1990). Wenn die Blutzufuhr unterbrochen wird, wie im Fall neonataler Asphyxie, so wird innerhalb von Minuten eine hypoxisch-ischämische Schädigung an dem stromabwärtigen Gebiet auftreten. Unter diesen Bedingungen der Sauerstoffverknappung verschiebt sich der Zellmetabolismus von aerob nach anaerob (Vannucci und Perlman, 1997), was weniger effektiv ist, um die Energiefordernisse der Zelle abzudecken. Dies führt zu einer Leerung der Energiespeicher, wobei insbesondere hochenergiereiche Phosphatreserven, wie etwa ATP, in den neuronalen und Gliazell-Kompartimenten beeinflusst werden (Dingledine und McBain, 1999). Es erfolgt eine gleichzeitige Akkumulation von  $\text{H}^+$ -Ionen, was zu Azidose führt, und eine Freisetzung freier Radikale, die zu einer weiteren Schädigung der Zellen beitragen.

**[0017]** Unter physiologischen Bedingungen wird die extrazelluläre Konzentration von Glutamat durch die Wirkung von Glutamat-Transportern, die sich in neuronalen Zellen, jedoch bevorzugt exprimiert in Gliazellen, befinden, auf niedrigen Mengenniveaus gehalten (Dingledine und McBain, 1999). Es gibt mehrere verschiedene Arten von Trägern (Carriern) der Glutamataufnahme, jedoch funktionieren im wesentlichen alle auf gleiche Weise, wobei sie zwei  $\text{Na}^+$ -Kationen und ein Glutamat-Anion in die Zelle transportieren, wogegen sie ein  $\text{K}^+$ -Kation und ein  $\text{OH}^-$ -Anion aus der Zelle heraus und in den extrazellulären Raum transportieren (Dingledine und McBain, 1999). Diese Zonenpumpen arbeiten gegen einen elektrochemischen Gradienten und benötigen daher Energie in Form von ATP, um korrekt zu funktionieren. Daher wird die Fähigkeit dieser Pumpen, das Membran-Ruhepotential aufrecht zu erhalten, durch die Reduzierung der ATP-Konzentration, die aus HI resultiert, vermindert. Folglich führt das Versagen der ATP-abhängigen Pumpe zur Depolarisation der Membran und zu einer Umkehr der Pumprichtung (Eilers und Bickler, 1996; Kauppinen et al, 1988). Somit wird Glutamat aus der Zelle heraus transportiert, und eine Oberschusskonzentration an Glutamat akkumuliert im extrazellulären Raum. Dabei steigt die Glutamatkonzentration nicht nur aufgrund einer verminderten Aufnahme an, sondern auch durch eine gesteigerte Freisetzung von Glutamat aus den präsynaptischen Enden, da die Membrandepolarisation ein Aktionspotential erzeugt (Dingledine und McBain, 1999). Beispiele dieser Prozesse, die zu überschüssigem extrazellulärem Glutamat führen, sind sowohl *in vitro* (Bosley et al, 1983; Hauptman et al, 1984; Pellegrino-Giampietro et al, 1990) als auch *in vivo* (Erecinska et al, 1984; Graham et al, 1990; Ikeda et al, 1989) beobachtet worden.

**[0018]** Exzitotoxizität findet statt, wenn das überschüssige extrazelluläre Glutamat kontinuierlich postsynaptische Rezeptoren (insbesondere NMDA-Rezeptoren) aktiviert, und der resultierende

Calciumeinstrom erzeugt einen osmotischen Gradienten, entlang dessen Wasser fließt, was ein Quellen der Zellen bewirkt. Es werden außerdem Calcium-abhängige Enzymsysteme in der Zelle aktiviert, und diese zwei Prozesse resultieren in akutem neuronalem Zelltod (Choi und Rothman, 1990).

#### Mechanismen des Zelltods

**[0019]** Es ist immer angenommen worden, dass neuronaler Zelltod aus einem von zwei Mechanismen heraus entsteht: Nekrose und Apoptose, wie als Hypothese von Wyllie et al (Wyllie et al, 1980) vorgeschlagen. Jedoch sind diese Kategorien jüngst in Frage gestellt worden, nachdem mehr Anhaltspunkte ans Licht gekommen sind, um nahe zu legen, dass Zelltod in die folgenden Kategorien unterteilt werden sollte: exzitotoxischer Zelltod und Apoptose (Olney, 2003). Der exzitotoxische Zelltod ist beschrieben worden als ein nekrotischer Prozess (Gwag et al, 1997; Katja und Green, 2001), als ein apoptotischer Prozess, und als ein Kontinuum dieser beiden (Leist und Nicotera, 1998; Nakajima et al, 2000). Apoptose und Nekrose werden gewöhnlich durch ihr deutlich verschiedenartiges morphologisches Erscheinungsbild voneinander unterschieden. Apoptose erfordert ATP und die Synthese neuer Proteine und wird identifiziert durch Zellschrumpfung, Chromatin-Verklumpung mit Margination und die Bildung membranumschlossener apoptotischer Körperchen, wogegen Nekrose durch Kernschrumpfung mit karyorrhektischen und pyknotischen Zellkernveränderungen erkannt wird (Hill et al, 1995).

**[0020]** Es ist für den Zelltod durch HI herausgefunden worden, dass dieser eine anfängliche Phase der Nekrose beinhaltet, gefolgt von einer verzögerten Welle von apoptotischem Zelltod (Northington et al, 2001). Der dadurch entstehende Verletzungstyp scheint sowohl zeit- als auch positionsabhängig zu sein, wobei die anfängliche nekrotische Verletzung auf das ipsilaterale Vorderhirn in einem Neugeborenenrattenmodell von HI beschränkt ist, und die verzögerte apoptotische Verletzung im Thalamus auftritt (Northington et al, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die verschiedenen Hirnregionen eine unterschiedliche Verletzlichkeit gegenüber jedem Typ von Zelltod zu unterschiedlichen Zeiten nach HI zeigen können.

**[0021]** In der normalen Entwicklung ist Apoptose ein reguläres Ereignis, durch das unerwünschte oder geschädigte Neuronen „Selbstmord begehen“ (Ikonomidou et al, 2001). Bei HI wird der anfängliche exzitotoxische Zelltod durch eine exzessive Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermittelt, was in der unkontrollierten Freisetzung von Glutamat resultiert, was wiederum die umgebenden Neuronen schädigt. Die natürliche Antwort auf Schädigung während der Synaptogenese besteht für die Neuronen darin, den programmierten Zelltod zu initiieren (Olney, 2003), und

man nimmt an, dass dies ein Mechanismus ist, der aktiviert wird, um das benachbarte Gewebe zu schützen (Leist und Nicotera, 1998).

#### Xenon als ein neuroprotektives Mittel

**[0022]** Es ist in der Technik bekannt, dass der NMDA-Rezeptor eine wesentliche Rolle bei der synaptischen Plastizität spielt, die vielen höheren kognitiven Funktionen zugrunde liegt, wie etwa dem Gedächtnis und dem Lernen, ebenso wie bei bestimmten nozizeptiven Signalwegen und bei der Schmerzempfindung (Collingridge et al, The NMDA Receptor, Oxford University Press, 1994). Zusätzlich deuten bestimmte Eigenschaften der NMDA-Rezeptoren darauf hin, dass diese an der Informationsverarbeitung im Gehirn beteiligt sein könnten, die dem Bewusstsein selbst zugrunde liegt.

**[0023]** NMDA-Rezeptorantagonisten sind aus einer Reihe von Gründen therapeutisch wertvoll. Erstens verleihen NMDA-Rezeptorantagonisten eine tiefgreifende Antischmerzwirkung (Analgesie), einen hochgradig erstrebenswerten Bestandteil allgemeiner Anästhesie und Sedierung. Zweitens sind NMDA-Rezeptorantagonisten unter vielen klinisch wichtigen Umständen (einschließlich Ischämie, Hirntrauma, neuropathischen Schmerzzuständen und bestimmten Typen von Krämpfen) neuroprotektiv. Drittens verleihen NMDA-Rezeptorantagonisten ein wertvolles Maß an Amnesie.

**[0024]** In Anbetracht der Wichtigkeit der NMDA-Rezeptoren bei der Pathogenese von HI ist es angebracht, dass NMDA-Antagonisten als mögliche neuroprotektive Mittel erforscht worden sind. Für viele NMDA-Antagonisten, wie etwa MK-801 und Ketamin, ist gezeigt worden, dass sie sowohl bei In vitro- als auch bei In vivo-Modellen neuroprotektiv sind (Albers et al, 1989; Arias et al, 1999; Choi et al, 1988; Kudo et al, 2001). Jedoch ist trotz dieser ermutigenden Ergebnisse für NMDA-Rezeptorantagonisten auch gezeigt worden, dass sie psychotomimetische Nebenwirkungen beim Menschen besitzen (Krystal et al, 1994) und Schädigung am posterioren Cingulum (PC) und den retrosplenialen Cortizes (RS) verursachen (Olney et al, 1991). Zusätzlich führen viele konventionelle NMDA-Rezeptorantagonisten zur Produktion unfreiwilliger Bewegungen, einer Stimulierung des sympathischen Nervensystems, einer Induktion von Neurotoxizität bei hohen Dosen (die erheblich ist, da NMDA-Rezeptorantagonisten geringe Stärken als allgemeine Anästhetika besitzen), einer Dämpfung des Myokard und Krampfförderung unter einigen Epilepsie-auslösenden Musterbedingungen, z. B. „Kindling“ (Wlaz P et al, Eur. J. Neurosci. 1994; 6: 1710–1719). Es hat außerdem erhebliche Schwierigkeiten bei der Entwicklung neuer NMDA-Rezeptorantagonisten gegeben, die befähigt sind, die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren.

**[0025]** Xenon ist ein apolares inertes Gas, das ein wirkungsstarker NMDA-Antagonist ist (Franks et al, 1998). Wie für andere NMDA-Antagonisten ist auch hier gezeigt worden, dass es gegenüber vielen Formen von neuronaler Verletzung, sowohl *in vitro* (Petzelt et al, 2003) als auch *in vivo* (Homi et al, 2003; Wilhelm et al, 2002) neuroprotektiv wirkt. Anders als viele andere der NMDA-Rezeptorantagonisten ist Xenon jedoch nicht neurotoxisch (Ma et al, 2002). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Xenon als ein NMDA-Antagonist besteht darin, dass das Molekül ein inertes, flüchtiges Gas ist, das rasch über die Atmung eliminiert werden kann.

**[0026]** Xenon besitzt zahlreiche weitere günstige Eigenschaften. Seit seiner ersten Verwendung in der Chirurgie (Cullen SC et al, Science 1951; 113: 580–582) hat eine Zahl von Forschungsgruppen gezeigt, dass es ein exzellentes pharmakologisches Profil besitzt, einschließlich des Fehlens metabolischer Nebenprodukte, einer tief greifenden Analgesie, schnellem Wirkungseintritt und schneller Erholung, sowie minimalen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System (Lachmann B et al, Lancet 1990; 335: 1413–1415; Kennedy RR et al, Anaesth. Intens. Care 1992; 20: 66–70; Lutrop HHH et al, Acta Anaesthesiol Scand. 1994; 38: 121–125; Goto T et al, Anesthesiology 1997; 86: 1273–1278; Marx T et al, Br. J. Anaesth. 1997; 78: 326–327). Darüber hinaus, da Xenon ein kleines ungeladenes Atom ist, kann es leicht durch die Blut-Hirn-Schranke hindurch treten und somit einen raschen Wirkungseintritt hervorrufen (Nakata et al, 2001). Es besitzt außerdem einen sehr niedrigen Blut:Gas-Verteilungskoeffizienten, was ein rasches Heraustreten aus der Xenon-Betäubung gewährt (Goto et al, 1997). Zusätzlich zu diesen Vorteilen ist Xenon nichtexplosiv, ungiftig und unreakтив (Shichino et al, 2002), und dies macht Xenon zu einem idealen Kandidaten zur Verwendung als neuroprotektives Mittel beim Neugeborenen.

**[0027]** Wie hier verwendet, bezeichnet der Begriff „neuroprotektives Mittel“ ein Mittel, das befähigt ist, eine Neuroprotektion bereitzustellen, d. h. eine neuronale Einheit, wie etwa ein Neuron, vor einer auftretenden Verletzung, z. B. einer ischämischen Verletzung oder einer traumatischen Verletzung, zu schützen.

#### Hypothermie als ein neuroprotektives Mittel

**[0028]** Talbot zeigte 1941 als Erster die neuroprotektiven Eigenschaften von Hypothermie für die chirurgische Anwendung (Talbot, 1941). Derzeit findet die einzige Routineanwendung der Hypothermie beim kardiopulmonalen Bypass statt, um das Gehirn vor intra-operativer Ischämie zu schützen. Jedoch hat es mehrere Publikationen gegeben, die die therapeutische Wirkung von Hypothermie bei anderen Modellen der Gehirnverletzung zeigen. Beispielsweise

existieren zahlreiche Veröffentlichungen, die die günstige Wirkung von Hypothermie sowohl bei *In vitro*- (Onitsuka et al, 1998) als auch bei *In vivo*-Modellen neonataler Asphyxie (Debillon et al, 2003; Treschera et al, 1997) zeigen. Es ist gezeigt worden, dass eine direkte Korrelation zwischen Gewebeverletzung und dem Ausmaß der Hirnkühlung besteht (Towfighi et al, 1994), und bei normoxischen Bedingungen führt jede Abnahme der Körpertemperatur um 1°C zu einer 5% Abnahme der Hirnstoffwechselrate (Vager and Asselin, 1996).

**[0029]** Der Mechanismus, durch den Hypothermie ihre neuroprotektive Wirkung ausübt, muss noch aufgeklärt werden, jedoch sind viele Theorien postuliert worden. Studien haben nahe gelegt, dass die Mechanismen, durch die die Hypothermie protektiv wirkt, temperatur- und zeitabhängig sind und an mehr als einem Punkt entlang der Kaskade der Ereignisse, die zur HI-Verletzung führen, wirken könnten (Vager und Asselin, 1996). Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass für eine moderate Temperatur von 31°C gezeigt wurde, dass sie neuroprotektiv wirkt, indem sie den cerebralen Energiestoffwechsel herabsetzt, während eine milde Hypothermie von 34°C, obwohl ebenfalls neuroprotektiv, keine Wirkung auf den Energiestoffwechsel hat und daher über einen anderen Mechanismus wirken muss (Vager und Asselin, 1996). Eine andere Studie durch Taylor et al (Taylor et al, 2002) zeigte, dass Hypothermie, die nach dem HI-Krankheitsereignis eingeleitet wurde, wirksamer war als intra-ischämische Hypothermie, und sie schlugen vor, dass dies an einer Verringerung schädigender Effekte liegen könnte, die während der Erholungsphase auftreten. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus könnte darin bestehen, dass die Hypothermie die exzitotoxische Schädigung vermindert, die während der Reperfusion auftritt (Taylor et al, 2002). Es sind viele andere Mechanismen des Schutzes durch Hypothermie vorgeschlagen worden, einschließlich der Reduzierung reaktiver Sauerstoffspezies (Taylor et al, 2002), einer Reduzierung der Gewebe-Azidose (Chopp et al, 1989) und der Abschwächung der nach HI stattfindenden (post-HI) neuronalen Apoptose (Xu et al, 2002).

#### Xenon und Hypothermie in Kombination

**[0030]** Wie oben erwähnt, betrifft ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem neonatalen Subjekt, wobei das Medikament zur Verwendung in Kombination mit Hypothermie bestimmt ist.

**[0031]** Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff "Hypothermie" darauf, dass ein bestimmtes Subjekt (in diesem Fall ein neonatales Subjekt) hypothermischen Bedingungen unterzogen wird, beispielsweise durch Verringern der Körpertemperatur bevorzugt um

3–5°C durch passive oder aktive Techniken. Typischerweise führt es zu einer Abnahme des Metabolismus der Körnergewebe des Subjekts, wenn dieses hypothermischen Bedingungen unterzogen wird, wodurch der Sauerstoffbedarf verringert wird.

**[0032]** Wie oben erwähnt, ist die Verwendung von Hypothermie bei der Behandlung neonataler Asphyxie in der Technik gut dokumentiert (siehe z. B. Volpe, 2001; Gunn et al, 2000). Jedoch hat es bis zum heutigen Zeitpunkt in der Technik keine Lehre und keinen Vorschlag gegeben, dass Hypothermie in Kombination mit der Verabreichung von Xenon verwendet werden könnte. Ebenso wenig hat es irgendwelche Andeutungen darüber gegeben, dass eine derartige Kombinationstherapie zu einer solch überraschenden und unerwarteten Verstärkung bei der resultierenden neuroprotektiven Wirkung führen würde.

**[0033]** Vorherige Studien durch den Anmelder haben gezeigt, dass Xenon neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Insbesondere die WO 01/08692, deren Inhalt hier durch Referenz in Bezug genommen wird, betrifft die Verwendung von Xenon als ein neuroprotektives Mittel und/oder als Inhibitor der synaptischen Plastizität. Jedoch gibt es im Stand der Technik weder Lehren noch Anregungen, dass Xenon wirksam als neuroprotektives Mittel im Kontext der vorliegenden beanspruchten Erfindung sein würde.

**[0034]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Xenon mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Träger gemischt.

**[0035]** Beispiele solcher geeigneter Hilfsstoffe für die verschiedenen unterschiedlichen Formen pharmazeutischer Zusammensetzungen, die hier beschrieben sind, sind im "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2. Auflage, (1994), herausgegeben von A Wade und PJ Weller, zu finden.

**[0036]** Verträgliche Träger oder Verdünnungsmittel für die therapeutische Verwendung sind in der pharmazeutischen Technik wohlbekannt und sind z. B. beschrieben in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro, Ausgabe von 1985). Beispiele geeigneter Träger beinhalten Laktose, Stärke, Glukose, Methylcellulose, Magnesiumstearat, Mannitol, Sorbitol und dergleichen. Beispiele geeigneter Verdünnungsmittel beinhalten Ethanol, Glycerol und Wasser.

**[0037]** Die Auswahl des pharmazeutischen Trägers, Hilfsstoffs oder Verdünnungsmittels kann im Hinblick auf die beabsichtigte Verabreichungsroute und die pharmazeutische Standardpraxis erfolgen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können als oder zusätzlich zu dem Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel (ein) beliebige(s) geeignete(s) Bindemittel,

Gleitmittel, Suspendiermittel, Beschichtungsmittel oder Solubilisiermittel (Lösungsvermittler) umfassen.

**[0038]** Beispiele geeigneter Bindemittel beinhalten Stärke, Gelatine, natürliche Zucker, wie etwa Glukose, wasserfreie Laktose, frei-fließende Laktose, beta-Laktose, Maissüßmittel, natürliches und synthetisches Gummi, wie etwa Akaziengummi, Tragacanth oder Natriumalginat, Carboxymethylcellulose und Polyethylenglykol.

**[0039]** Beispiele geeigneter Gleitmittel beinhalten Natriumoleat, Natriumstearat, Magnesiumstearat, Natriumbenzoat, Natriumacetat, Natriumchlorid und dergleichen.

**[0040]** Konservierungsstoffe, Stabilisatoren und Farbstoffe können in der pharmazeutischen Zusammensetzung bereitgestellt werden. Beispiele von Konservierungsstoffen beinhalten Natriumbenzoat, Sorbinsäure und Ester von p-Hydroxybenzoësäure. Antioxidantien und Suspendiermittel können ebenfalls verwendet werden.

**[0041]** Die vorliegende Erfindung ist auch auf die Behandlung von Tieren anwendbar. In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung weiterhin die Verwendung von Xenon in Kombination mit einem veterinärmedizinisch verträglichen Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Träger.

**[0042]** Für die veterinärmedizinische Verwendung wird das Xenon typischerweise in Übereinstimmung mit der normalen veterinärmedizinischen Praxis verabreicht, und der Veterinärchirurg wird das Dosierungsschema und die Verabreichungsroute bestimmen, die für ein bestimmtes Tier am geeignetsten sein werden.

**[0043]** Das Xenon kann auch in Kombination mit einem anderen pharmazeutisch aktiven Mittel verabreicht werden. Das Mittel kann jedwedes geeignete pharmazeutisch aktive Mittel sein, einschließlich anästhetischer oder sedierender Mittel, die die GABAergene Aktivität fördern. Beispiele solcher GABAergener Mittel beinhalten Isofluran, Propofol und Benzodiazepine.

**[0044]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon in Kombination mit einem flüchtigen anästhetischen Mittel, bevorzugt Isofluran, Sevofluran oder Desfluran, verabreicht.

**[0045]** Das Xenon kann auch in Kombination mit anderen aktiven Bestandteilen, wie etwa L-Typ-Calciumkanal-Blockern, N-Typ-Calciumkanal-Blockern, Substanz-P-Antagonisten, Natriumkanalblockern, purinergen Rezeptorblockern oder Kombinationen hiervon verabreicht werden.

**[0046]** Das Xenon kann durch jedweden geeigneten Auslieferungsmechanismus oder durch zwei oder mehr geeignete Auslieferungsmechanismen verabreicht werden.

**[0047]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon durch Perfusion verabreicht. Im Kontext der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff „Perfusion“ auf die Einführung eines Sauerstoff/Xenon-Gemischs in, sowie die Entfernung von Kohlendioxid aus einem Patienten unter Verwendung einer spezialisierten Herz-Lungen-Maschine. In allgemeinen Begriffen ersetzt die Herz-Lungen-Maschine die Funktion von Herz und Lunge und stellt eine blutfreie, bewegungslose Operationsfläche für den Chirurgen bereit. Der Bedienende der Herz-Lungen-Maschine („Perfusionist“) ventiliert das Blut des Patienten, um den Spiegel an Sauerstoff und Kohlendioxid zu kontrollieren. Im Kontext der vorliegenden Erfindung führt der Perfusionist außerdem Xenon ins Blut des Patienten ein. Der Perfusionist treibt das Blut dann in das arterielle System zurück, um den nährenden Blutfluss zu allen lebenswichtigen Patientenorganen und -Geweben während der Operation bereitzustellen.

**[0048]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegt das Medikament in gasförmiger Form vor.

**[0049]** Bei einer weiteren hochgradig bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon durch Inhalation verabreicht. Bevorzugter wird das Xenon durch Inhalation eines 70–30%igen (v/v) Xenon/Sauerstoff-Gemischs verabreicht.

**[0050]** Bevorzugter wird das Xenon in Form eines 20–70%igen (v/v) Xenon/Luft-Gemischs verabreicht.

**[0051]** Bei wiederum einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt das Medikament in Form einer Flüssigkeit oder Lösung vor.

**[0052]** Bevorzugt wird die Flüssigkeit in Form einer Lösung oder einer Emulsion, die aus sterilen oder sterilisierbaren Lösungen hergestellt wird, verabreicht, und wobei diese intravenös, intraarteriell, intrathecal, subkutan, intradermal, intraperitoneal oder intramuskulär injiziert werden können.

**[0053]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon in Form einer Lipid-Emulsion verabreicht. Die intravenöse Formulierung enthält typischerweise eine Lipid-Emulsion (wie etwa die kommerziell erhältlichen Emulsionen Intralipid® 10, Intralipid® 20, Intrafat®, Lipofundin® S oder Liposyn®, oder eine Emulsion, die zur Maximierung der Löslichkeit in spezifischer Weise formuliert wurde), die die Löslichkeit des Xenons hinreichend erhöht, um den gewünschten klinischen Effekt zu erreichen. Weitere

Informationen über Lipid-Emulsionen dieser Art sind zu finden in G. Kleinberger und H. Pamper, Infusionstherapie, 108–117 (1983) 3.

**[0054]** Die Lipidphase der vorliegenden Erfindung, die das Gas löst oder dispergiert, wird typischerweise aus gesättigten und ungesättigten langkettigen und mittelkettigen Fettsäureestern mit 8 bis 30 Kohlenstoffatomen gebildet. Diese Lipide bilden in wässriger Lösung Liposomen. Beispiele beinhalten Fischöl und Pflanzenöle, wie etwa Sojabohnenöl, Distelöl oder Baumwollsamenöl. Die Lipid-Emulsionen der Erfindung sind typischerweise Öl-in-Wasser-Emulsionen, bei denen der Anteil an Fett in der Emulsion günstiger Weise 5 bis 30 Gew.-% beträgt, und bevorzugt 10 bis 20 Gew.-%. Öl-in-Wasser-Emulsionen dieser Art werden oft in Gegenwart eines Emulgators, wie etwa Soja-Phosphatid, hergestellt.

**[0055]** Die Lipide, die die Liposomen der vorliegenden Erfindung bilden, können natürlich oder synthetisch sein und beinhalten Cholesterin, Glykolipide, Sphingomyelin, Glukolipide, Glykosphingolipide, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol.

**[0056]** Die Lipid-Emulsionen der vorliegenden Erfindung können auch zusätzliche Komponenten umfassen. Diese können Antioxidantien, Zusatzstoffe zur isotonischen Angleichung der Osmolarität der die Lipidphase umgebenden wässrigen Phase an das Blut, oder Polymere, die die Oberfläche der Liposomen modifizieren, beinhalten.

**[0057]** Es ist festgestellt worden, dass beträchtliche Mengen an Xenon zu einer Lipid-Emulsion hinzugegeben werden können. Selbst mit einfachsten Mitteln, bei 20°C und normalem Druck, kann Xenon in Konzentrationen von 0,2 bis 10 ml oder mehr pro ml Emulsion gelöst oder dispergiert werden. Die Konzentration an gelöstem Gas ist von einer Anzahl von Faktoren abhängig, einschließlich der Temperatur, dem Druck und der Lipid-Konzentration.

**[0058]** Die Lipid-Emulsionen der vorliegenden Erfindung können mit gasförmigem Xenon beladen werden. Im allgemeinen wird eine Vorrichtung mit der Emulsion gefüllt, und Anästhetika, wie etwa Gase oder Dämpfe, geleitet durch gesinterte Glas-Sprudelvorrichtungen, werden der Immersion in der Emulsion unterzogen. Man lässt die Emulsion sich bei einem gewählten Partialdruck mit dem Gas oder Dampf des Anästhetikums äquilibrieren. Bei Lagerung in gasdichten Behältern zeigen diese Lipid-Emulsionen eine hinreichende Stabilität für das Anästhetikum, um während konventioneller Lagerungszeitspannen nicht als ein Gas freigesetzt zu werden.

**[0059]** Die Lipid-Emulsionen der vorliegenden Erfindung können derart geladen werden, dass das Xenon auf Sättigungsniveau vorliegt. Alternativ kann das Xenon in niedrigeren Konzentrationen vorhanden sein, unter der Voraussetzung z. B., dass die Verabreichung der Emulsion die gewünschte pharmazeutische Aktivität hervorbringt.

**[0060]** Die bei dieser Erfindung verwendete Xenon-Konzentration kann die Minimalkonzentration sein, die benötigt wird, um die gewünschte klinische Wirkung zu erreichen. Es ist für einen Arzt gebräuchlich, die tatsächliche Dosis zu bestimmen, die für einen individuellen Patienten am geeignetsten sein wird, und diese Dosis wird mit dem Alter, Gewicht und der Antwort des jeweiligen Patienten variieren. Es kann natürlich individuelle Umstände geben, bei denen höhere oder niedrigere Dosisbereiche günstig sind, und diese liegen im Schutzmfang dieser Erfindung.

**[0061]** Bevorzugt liegt das Medikament in einer Form vor, die für die intravenöse, neuraxiale oder transdermale Auslieferung geeignet ist.

**[0062]** Bevorzugt wird das Xenon simultan, in Kombination, sequenziell oder separat mit Hypothermie verabreicht.

**[0063]** Wie hier verwendet, wird „simultan“ verwendet, um auszudrücken, dass das Xenon gleichzeitig mit der Hypothermie verabreicht wird, wogegen der Begriff „in Kombination“ verwendet wird, um auszudrücken, dass das Xenon, wenn schon nicht simultan, dann „sequenziell“ in einem Zeitrahmen verabreicht wird, in dem Xenon und die Hypothermie beide eine therapeutische Wirkung zeigen, d. h. sie sind beide verfügbar, um therapeutisch im gleichen Zeitrahmen zu wirken. Somit kann es die „sequenzielle“ Verabreichung erlauben, dass das Xenon innerhalb von 5 Minuten, 10 Minuten oder im Bereich von Stunden vor der Hypothermie verabreicht wird, vorausgesetzt, die Xenon-Halbwertszeit im Blutkreislauf ist derart, dass es in einer therapeutisch wirksamen Menge vorliegt, wenn das neonatale Subjekt den Hypothermiebedingungen ausgesetzt wird.

**[0064]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Neugeborene der Hypothermie vor der Behandlung mit Xenon unterzogen.

**[0065]** Im Gegensatz zu „in Kombination“ oder „sequenziell“ wird „separat“ hier verwendet, um auszudrücken, dass die Lücke zwischen der Verabreichung des Xenons und der Exposition des neonatalen Subjekts der Hypothermie gegenüber signifikant ist, d. h. das Xenon könnte nicht mehr im Blutstrom in einer therapeutisch wirksamen Menge vorliegen, wenn das neonatale Subjekt Hypothermiebedingungen ausge-

setzt wird.

**[0066]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon sequenziell mit Hypothermie verabreicht.

**[0067]** Bevorzugter wird das Xenon sequenziell vor der Hypothermie verabreicht.

**[0068]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon separat vor der Hypothermie verabreicht.

**[0069]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon sequenziell nach der Hypothermie verabreicht.

**[0070]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon separat nach der Hypothermie verabreicht.

**[0071]** Bevorzugter wird das Xenon sequenziell oder simultan mit der Hypothermie verabreicht, bevorzugter simultan.

**[0072]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Xenon in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht.

**[0073]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon in einer sub-therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Mit anderen Worten wird das Xenon in einer Menge verabreicht, die unzureichend wäre, um die gewünschte therapeutische Wirkung zu erzeugen, wenn sie in Abwesenheit der hypothermischen Bedingungen verabreicht würde.

**[0074]** Noch bevorzugter besitzt die Kombination aus Xenon und Hypothermie eine synergistische Wirkung, d. h. die Kombination ist synergistisch.

**[0075]** Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Xenon vor dem hypoxischen Krankheitsereignis verabreicht. Somit ist es bei einer bevorzugten Ausführungsform so, dass das Xenon dem Neugeborenen vor der Geburt über die Mutter verabreicht wird, z. B. durch Verabreichung an die Mutter vor oder während der Wehen. Bevorzugt wird das Xenon der Mutter für bis zu etwa 48 oder 24 Stunden vor der Geburt verabreicht, bevorzugter bis zu etwa 12 Stunden, bevorzugter bis zu etwa 6 Stunden oder 3 Stunden oder 1 Stunde vor der Geburt. Nach der Geburt wird das Neugeborene dann den hypothermischen Bedingungen unterzogen.

**[0076]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem Säugling, der dies benötigt, wobei man:

(a) eine therapeutisch wirksame Menge an Xenon an die Mutter des Säuglings vor und/oder während

der Wehen verabreicht; und

(b) den Säger nach der Geburt der Hypothermie unterzieht.

**[0077]** Bevorzugt wird die Hypothermie für eine Zeitspanne von wenigstens etwa 6 Stunden, bevorzugter von wenigstens etwa 12 Stunden nach dem hypoxisch-ischämischen (HI) Krankheitsereignis aufrechterhalten.

**[0078]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Hypothermie für eine Zeitspanne von etwa 6 bis etwa 24 Stunden nach dem hypoxisch-ischämischen (HI) Krankheitsereignis aufrechterhalten.

**[0079]** Bevorzugt wird die Hypothermie für eine Zeitspanne von wenigstens etwa 6 Stunden, bevorzugter von wenigstens etwa 12 Stunden, nach der Geburt aufrechterhalten.

**[0080]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Hypothermie für eine Zeitspanne von etwa 6 bis etwa 24 Stunden nach der Geburt aufrechterhalten.

**[0081]** Bevorzugt wird die Behandlung in Übereinstimmung mit der Erfindung innerhalb von etwa 6 Stunden im Bezug auf das hypoxisch-ischämische (HI) Krankheitsereignis, und bevorzugter innerhalb von etwa 2 Stunden im Bezug auf das hypoxisch-ischämische Krankheitsereignis gestartet.

**[0082]** Die Hypothermie kann passiv erzeugt werden, indem man ein Absinken der Temperatur zulässt, ohne die Körpertemperatur dabei zielgerichtet aufrecht zu erhalten. Da sie poikilotherm sind, nehmen Neugeborene rasch die Temperatur ihrer Umgebung an. Alternativ kann der Patient aktiv hypotherm gemacht werden, indem man gezielt dessen Umgebungstemperatur reduziert.

**[0083]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem Säger, der dies benötigt, indem man:

- (a) eine therapeutisch wirksame Menge an Xenon an den Säger verabreicht; und
- (c) den Säger der Hypothermie oder hypothermischen Bedingungen unterwirft.

**[0084]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Säger ein neugeborenes Subjekt in den ersten vier Wochen nach der Geburt. Bevorzugter befindet sich der Säger in den ersten zwei Wochen, noch bevorzugter in der ersten Woche nach der Geburt.

**[0085]** Bevorzugt ist der Säger ein Mensch.

**[0086]** Bevorzugt wird der Säger Bedingungen milder Hypothermie unterworfen. Wie hier verwendet, bezieht sich der Begriff „milde“ Hypothermie typischerweise auf eine Abnahme der Kerntemperatur

von 37°C bis auf etwa 33°C.

**[0087]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Temperatur des Sägers auf einer Temperatur von etwa 31°C bis etwa 36°C gehalten.

**[0088]** Bevorzugt wird die Temperatur des Sägers auf einer Temperatur von etwa 32°C bis etwa 36°C, bevorzugter von etwa 32°C bis etwa 35°C, noch bevorzugter von etwa 33°C bis etwa 35°C gehalten.

**[0089]** Bevorzugte Ausführungsformen für den zweiten Aspekt der Erfindung sind die gleichen, wie sie oben im Hinblick auf den ersten Aspekt beschrieben sind.

**[0090]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Behandlung neonataler Asphyxie bei einem Säger, der dies benötigt, durch die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge an Xenon an den Säger in Kombination mit Hypothermie.

**[0091]** Wiederum ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung neonataler Asphyxie, wobei die Behandlung die simultane, sequenzielle oder separate Verabreichung von Xenon in Kombination mit Hypothermie an ein Subjekt umfasst.

**[0092]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung von Xenon in Kombination mit Hypothermie für die Behandlung neonataler Asphyxie.

#### In Vivo-Studien

**[0093]** Unter Verwendung eines Tiermodells für HI wurden neu geborene Ratten unabhängig voneinander der Behandlung mit Xenon und Hypothermie unterzogen. Für Xenon wurde gezeigt, dass es bei den Neugeborenen neuroprotektiv gegenüber HI wirkt, indem es die Menge an apoptotischem Zelltod reduziert, während Hypothermie weniger effektiv zu sein schien. In Kombination wirkten Xenon und Hypothermie über einen anti-apoptotischen Mechanismus neuroprotektiv ([Fig. 17](#)). Ihre kombinierte Wirkung wurde als synergistisch ermittelt.

**[0094]** Das neonatale Ratten-Modell für HI ist sehr gut etabliert und ist für die Verwendung bei einer Anzahl vorheriger Studien validiert worden (Levine, 1960; Rice et al, 1981). Für das Alter der bei diesem Modell verwendeten Ratten wurde herausgefunden, dass sich dieses entsprechend der Gehirnreife beim zeitlich normal geborenen menschlichen Neugeborenen verhält (Clancy et al, 2001; Ikonimou et al, 1989), sodass ein angemessen genauer Vergleich zwischen den beiden angestellt werden kann.

**[0095]** Während der Hypothermieexperimente wurde die Temperatur der Rattenbabys unter Verwendung einer Sonde überwacht, die in den Cortex eines der Babys eingesetzt wurde. Die Sonde benötigte etwa 15 Minuten, um zu äquilibrieren, und dies wurde ermöglicht, indem man die Startzeit des Versuchs hinauszögerte, bis die Sonde begann, die korrekte Temperatur aufzuzeichnen. Es gab Fluktuationen der Temperatur um den Mittelwert, jedoch wurden diese durch kontinuierliche Überwachung und, wie es nötig war, manuelle Anpassung des Wasserbades, kontrolliert. Es wurde nur eine Ratte pro Gruppe hinsichtlich der Temperatur überwacht, um das Trauma, das den Ratten gegenüber verursacht wurde, und auch den Schaden, der am Cortex durch die Sonde verursacht wird, zu minimieren; Ratten mit der eingesetzten Sonde konnten nicht für die histologische Analyse verwendet werden.

**[0096]** Für das anästhetische Gas Xenon ist gezeigt worden, dass es Neuroprotektion bei verschiedenen Modellen adulter neuronaler Verletzung zeigt. Derzeit existieren keine veröffentlichten Daten, um den gleichen neuroprotektiven Effekt von Xenon bei Neugeborenen zu bestätigen. Die Ergebnisse dieser Studie bekräftigen die vorherigen Ergebnisse, dass Xenon signifikante neuroprotektive Eigenschaften besitzt und legen zusätzlich nah, dass sich diese Neuroprotektion auch auf neonatale Modelle der Hirnverletzung, die durch Hypoxie-Ischämie induziert wird, erstreckt.

**[0097]** Es ist seit langem bekannt, dass die Aktivierung des NMDA-Subtyps des Glutamat-Rezeptors benötigt wird, um die anhaltende neuronale Verletzung und den Tod bei HI aufrecht zu erhalten, und es ist gut dokumentiert, dass Xenon seine analgetische und anästhetische Wirkung über die Blockade dieser Rezeptoren ausübt; somit ist postuliert worden, dass die neuroprotektiven Eigenschaften von Xenon ein Ergebnis dieses Antagonismus sind. Zuvor haben mehrere andere NMDA-Antagonisten Neuroprotektion bei In-vitro-Studien gezeigt, haben jedoch schließlich versagt, wenn sie in klinischen Situationen verwendet wurden (Muir und Lees, 1995). Der Grund hinter diesem klinischen Versagen ist unbekannt, jedoch ist es möglich, dass die Blockade des Glutamatrezeptor-Subtyps unzureichend ist, um vor Verletzung zu schützen, was implizieren würde, dass Xenon seine neuroprotektive Wirkung durch einen anderen Mechanismus ausübt.

**[0098]** In der vorliegenden Studie ist gezeigt worden, dass Xenon über einen anti-apoptotischen Mechanismus in signifikanter Weise gegenüber neonataler HI schützt. Sowohl Apoptose als auch Nekrose sind wichtige Komponenten des neuronalen Verlusts nach HI-Verletzung, jedoch scheint Apoptose der wichtigere Typ von Zelltod bei der Bestimmung des neonatalen Schicksals zu sein (Taylor et al, 1999).

**[0099]** Dem apoptotischen Tod geht oft die Aktivierung zahlreicher Gene (einschließlich Transkriptionsfaktoren) voraus, wobei diese entweder pro-apoptotisch oder anti-apoptotisch sein können. Da Xenon in den apoptotischen Zelltod einzugreifen scheint, ist es möglich, dass es seine Wirkung auf eines dieser Gene ausübt, oder an irgendeinem Punkt entlang des apoptotischen Signalwegs. Derzeit gibt es Anhaltspunkte für zwei verschiedene Apoptosewege: den extrinsischen Weg und den intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg (auch bezeichnet als der „Death-Rezeptor-Pathway“) beinhaltet die Bindung von Zytokinen an Death-Rezeptoren, die Caspase 8 aktivieren, was wiederum die „ausführende Caspase“, Caspase 3, aktiviert, die damit fortfährt, den apoptotischen Zelltod zu induzieren (Mehmet, 2000). Der intrinsische Pathway ist stark abhängig von Mitochondrien und beinhaltet eine Steigerung der mitochondrialen Membranpermeabilität, die durch das pro-apoptotische Protein bax verursacht wird. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c, der Bildung eines Komplexes aus Cytochrom c, Apaf-1 (Apoptose-Proteaseaktivierender Faktor-1) und Caspase-9, sowie zur nachfolgenden Aktivierung von Caspase-3. Es ist absolut möglich, dass Xenon auf irgendeinen dieser beiden Signalwege einwirkt, wobei es jedoch Anhaltspunkte gibt, die nahe legen, dass die durch HI induzierte apoptotische Neurodegeneration über den mitochondrialen Weg und das Auslösen bax-abhängiger mitochondrialer Veränderungen vermittelt wird (Taylor et al, 1999). Weiterhin ist für den NMDA-Antagonisten Ketamin gezeigt worden, dass dieser gegen unvollständige cerebrale Ischämie und Reperfusion schützt, indem frühzeitig die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen moduliert wird, und zwar durch das Inhibieren des durch HI induzierten Anstiegs von bax (Engelhard et al, 2003). Es ist somit möglich, dass Xenon die Apoptose inhibieren könnte, indem es bax herunterreguliert. Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein, das die Wirkung hat, die Permeabilität der Mitochondrien zu verringern und somit die Freisetzung von Cytochrom c inhibiert. Für seine Überexpression ist gezeigt worden, dass sie die neuronale Schädigung verringert, die durch transiente globale cerebrale Ischämie bei Rennmäusen verursacht wurde (Engelhard et al, 2003). Daher ist das Heraufregulieren von bcl-2 ein weiteres potentielles Target für Xenon. Da Xenon unpolar und fettlöslich ist, ist es in der Lage, sich im Körper weit zu verteilen. Es kann Membranen durchdringen und folglich kann es auch eine Wirkung im Zellkern besitzen, indem es die Gentranskription verändert, um Signalwege des Überlebens heraufzuregulieren oder die RNA- und Proteinsynthese pro-apoptotischer Moleküle zu inhibieren.

**[0100]** Es wurde für die Antinekrose durch Xenon gezeigt, dass diese im Cortex bei 48 Stunden signifikant ist, nicht jedoch im Gyrus ([Fig. 16](#)). In allen anderen Zeitgruppen war Xenon nicht antinekrotisch.

Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, dass es in Übereinstimmung mit einer vorherigen Studie (Northington et al, 2001) eine zweite Welle des nekrotischen Zelltods nach 48 Stunden gibt, die nur im Cortex erkennbar ist. Dies würde den Anstieg des Prozentsatzes nekrotischer Zellen erklären, die bei den Positivkontrollen, im Vergleich zu 16 und 24 h, nach 48 Stunden vorlagen. Obwohl nicht sicher ist, wie Xenon eine antinekrotische Wirkung im Cortex bei 48 Stunden ausübt, mag es so sein, dass Xenon, obwohl es unfähig ist, Nekrose zu verhindern, die vor seiner Verabreichung erfolgt (wie in den Gruppen mit 16 und 24 Stunden), es jedoch irgendwie in der Lage ist, die zweite nekrotische Welle zu bekämpfen, die nach seiner Verabreichung stattfindet. Eine anfängliche Nekrose erfolgt bereits nach nur 3 Stunden nach dem HI-Anfall (Northington et al, 2001), und zu diesem Zeitpunkt ist Xenon noch nicht verabreicht worden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass es in der Lage ist, einen Prozess, der bereits stattgefunden hat, anzuhalten oder umzukehren. Die zweite nekrotische Welle erfolgt jedoch zu einem Zeitpunkt, an dem Xenon im Gehirn seit 48 Stunden anwesend war, und dies liegt nah, dass die Anwesenheit von Xenon bei Beginn der Nekrose in der Lage sein könnte, diesen Typ von Zelltod zu verringern. Es muss weitere Arbeit fertig gestellt werden, um den genauen Mechanismus dieser Interaktion festzustellen.

**[0101]** Vorherige Studien haben gezeigt, dass milde Hypothermie mit 33°C neuroprotektiv gegenüber ischämischer neuronaler Verletzung ist (Gusto et al, 1987). Andere Studien haben nahe gelegt, dass diese Neuroprotektion über einen anti-apoptotischen Mechanismus erreicht wird (Xu et al, 2002). Experimente haben gezeigt, dass es keine Neuroprotektion bei 16 h oder 24 h gab ([Fig. 13](#) bzw. [Fig. 15](#)).

**[0102]** Bei 48 Stunden jedoch wurde eine signifikante Neuroprotektion sowohl im Cortex als auch im Gyrus erreicht, jedoch über unterschiedliche Mechanismen. Im Cortex wirkt Hypothermie antinekrotisch, und im Gyrus wirkt sie anti-apoptotisch ([Fig. 16](#)). Die Daten in dieser Studie erklären nicht diesen Effekt, jedoch könnte eine mögliche Erklärung darin bestehen, dass verschiedene Gehirnregionen eine unterschiedliche Verletzlichkeit zeigen (Northington et al, 2001). Im Cortex findet die zweite nekrotische Welle (oben diskutiert) zu einer Zeit statt, zu der die Hypothermie bereits verabreicht wurde, und dies steigert die Wirksamkeit. Im Gyrus jedoch gibt es keine verzögerte Nekrose, und somit wird kein anti-nekrotischer Effekt beobachtet. Anti-Apoptose scheint der neuroprotektive Mechanismus in dieser Region zu sein, und es ist möglich, dass der erwartete anti-apoptotische, neuroprotektive Effekt von Hypothermie, der zu den früheren Zeitintervallen nicht offenkundig ist, nach längeren Zeitspannen zutage treten kann.

**[0103]** Die Ergebnisse zeigten, dass 20% Xenon

und 35°C Hypothermie bei Verwendung in Kombination ein erstaunliches Maß an Neuroprotektion bereitstellen. Da diese Werte keine Neuroprotektion bereitstellen, wenn jedes Mittel für sich alleine verwendet wurde, kann das Ergebnis nicht durch einen additiven Mechanismus erklärt werden, sondern muss stattdessen durch eine synergistische Interaktion zwischen den beiden Mitteln begründet sein.

**[0104]** Zusammenfassend hat die vorliegende Studie gezeigt, wie ein In vivo-Modell der Ratte verwendet wird, um zu zeigen, dass Xenon neuroprotektiv im Neugeborenen ist und signifikant gegenüber Apoptose schützt, die durch hypoxisch-ischämische Verletzung induziert wird. Die Daten dieser Studie legen außerdem nah, dass Xenon und Hypothermie, wenn sie in Kombination bei dem gleichen Modell verwendet werden, synergistisch interagieren, um den apoptotischen Zelltod dramatisch zu verringern. Dementsprechend kann diese Kombination eine wirksame Behandlung darstellen, um vor den verheerenden neurologischen Konsequenzen neonataler Asphyxie zu schützen.

**[0105]** Die vorliegende Erfindung wird weiterhin mittels Beispiel und unter Bezugnahme auf die folgenden Figuren beschrieben, wobei:

**[0106]** [Fig. 1](#) die Beziehung zwischen der Schädigung, wie gemessen durch den Verlust des Gehirngewichts (Verhältnis rechte Hemisphäre/linker Hemisphäre), und der Dauer der hypoxischen Phase (in Minuten) in Sprague-Dawley-Ratten zeigt.

**[0107]** [Fig. 2](#) Gehirnschnitte von Sprague-Dawley-Ratten, die 90 Minuten der hypoxisch-ischämischen Verletzung erduldet haben, zeigt.

**[0108]** [Fig. 3](#) den Haupt-Zellschaden, der bei Sprague-Dawley-Ratten 24 Stunden nach einer 90-minütigen Hypoxie-Ischämie ersichtlich ist, zeigt.

**[0109]** [Fig. 4](#) die Konzentrationsabhängigkeit der Xenon-Neuroprotektion (Verhältnis des Gewichts der rechten Hemisphäre/linken Hemisphäre gegenüber der Xenon-Konzentration) zeigt.

**[0110]** [Fig. 5](#) die Wirkung von 70% Xenon auf die neurologischen Funktionen, die längere Zeit nach dem hypoxisch-ischämischen (HI) Krankheitsereignis bestimmt wurden, zeigt.

**[0111]** [Fig. 6](#) die neuroprotektive Wirkung (Verhältnis rechte Hemisphäre/linken), beobachtet mit N<sub>2</sub> bzw. Xenon, wenn Xenon 2 Stunden nach dem HI-Krankheitsereignis verabreicht wird, vergleicht.

**[0112]** [Fig. 7](#) die Wirkung milder Hypothermie auf den neuroprotektiven Effekt von Xenon (LDH-Freisetzung gegenüber der Xenon-Konzentration, % atm)

zeigt.

[0113] [Fig. 8](#) eine van't Hoff-Auftragung des natürlichen Logarithmus der LDH-Freisetzung, aufgetragen gegen die reziproke absolute Temperatur, zeigt.

[0114] [Fig. 9](#) eine Photographie der zweckgerichtet aufgebauten luftdichten Kammern zeigt, die für die Gaszufuhr verwendet wurden. Das Wasserbad und der geschlossene Kreislauf des Xenon-Auslieferungssystems sind ebenfalls dargestellt.

[0115] [Fig. 10](#) zeigt einen schematischen Zeitverlauf des verwendeten Verfahrens. 60 Minuten ist die Zeitspanne, die für die Operation bei  $n = 12$  Babys verwendet wird. Die Erholungsphasen wurden beim Muttertier durchgeführt. Die verwendeten Interventionen waren: scheinbehandelte Tiere, Positivkontrollen, 75% Xenon (Restmenge: Sauerstoff), 33°C Hypothermie, 20% Xenon (25% Sauerstoff, 55% Stickstoff), 35°C Hypothermie und eine Kombination von 35°C Hypothermie und 20% Xenon. Solange nicht anders angezeigt, wurden die Tiere bei 37°C gehalten und atmeten ein Gasgemisch aus 25% Sauerstoff, aufgefüllt mit Stickstoff als Restmenge. Die scheinbehandelten Tiere erhielten einen Einschnitt, jedoch kein Abbinden oder HI, und Positivkontrollen erhielten sowohl die Operation als auch HI. Die Tiere in jeder Gruppe wurden gleichmäßig zwischen den verschiedenen Erholungsphasen (16, 24 und 48 h) aufgeteilt, bevor sie getötet wurden.

Abkürzungen: HI, Hypoxie-Ischämie.

[0116] [Fig. 11](#) zeigt (A) den Sagittalschnitt eines Rattenhirns, modifiziert, von der Internetseite [culty.virginia.edu/.../RatBrainLabels.ipg](http://culty.virginia.edu/.../RatBrainLabels.ipg). Die durchbrochene Linie stellt die Fläche des Gehirns dar, an der die Koronalschnitte (B) vorgenommen wurden, etwa –3,6 mm vom Bregma. (B) zeigt einen mit Cresyl-Violett gefärbten Koronalschnitt. Die Kästchen zeigen die Regionen an, wo die Zählrahmen platziert und die Zellen analysiert wurden; das obere Kästchen zeigt den Cortex, und das untere Kästchen zeigt den Gyrus. Das „X“ liegt auf einer Öffnung, die absichtlich mit einem Sicherheitsstift erzeugt wurde, um die nicht-abgebundene (contralaterale) Hemisphäre zu zeigen.

[0117] [Fig. 12](#) zeigt eine mikroskopische Aufnahme des Cortex (mit Cresyl-Violett gefärbt), aufgenommen mit einer 100x Öl-Immersionslinse und einer Axiocam Digitalkamera, was den Unterschied des morphologischen Erscheinungsbilds zwischen einer apoptotischen, nekrotischen und lebensfähigen Zelle zeigt. Lebensfähige Zellen werden weniger intensiv angefärbt als beide Typen von Zelltod und besitzen daher ein blasseres Zytoplasma, wogegen tote Zellen dunkler angefärbt werden. Nekrotische und apoptotische Zellen werden auf Basis ihrer verschiede-

nen Zellkernerscheinungsbilder unterschieden – nekrotische Zellkerne sind groß und unregelmäßig geformt, wogegen apoptotische Zellkerne klein, eingeschrumpft und kugelförmig sind.

[0118] [Fig. 13](#) zeigt, dass Xenon bei 16 h über einen anti-apoptotischen Mechanismus neuroprotektiv wirkt. Spezifischer ausgedrückt, zeigt [Fig. 13](#) Diagramme für den apoptotischen und nekrotischen neuronalen Tod, der durch hypoxische Ischämie induziert wird, und die Wirkungen von 75% Xenon und 33°C Hypothermie auf einen solchen Zelltod nach 16 h in (A) dem Cortex und (B) dem Gyrus. In beiden Hirnregionen steigerte Xenon in signifikanter Weise den Prozentanteil lebensfähiger Zellen und verringerte ebenso den Prozentanteil apoptotischer Zellen, wenn man dies mit Positivkontrollen verglich. Im Cortex verringerte die Hypothermie den Prozentanteil apoptotischer Zellen, obwohl sie nicht zu einer Steigerung der Zahl lebensfähiger Zellen führte, weshalb sie hier nicht als neuroprotektiv betrachtet werden kann. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber Positivkontrollen.

[0119] [Fig. 14](#) zeigt eine Mikroskopieaufnahme, die den Cortex und den Gyrus bei scheinbehandelten Tieren, Positivkontrollen und 75% Xenon-Tieren nach 16 Stunden zeigt. Die 75%-Gruppe ist im Erscheinungsbild der scheinbehandelten Gruppe ähnlicher als der Positivkontrollgruppe. Die bestätigt die neuroprotektive Wirkung von Xenon bei 16 Stunden. Der Gyrus der Kontrollgruppe ist hinsichtlich der Form verzerrt, was auf die gesteigerte Menge an Zelltod und Vakuolen-Bildung zurückgeht.

[0120] [Fig. 15](#) zeigt, dass Xenon bei 24 h über einen anti-apoptotischen Mechanismus neuroprotektiv wirkt. Spezifischer ausgedrückt, zeigt [Fig. 15](#) Diagramme für den apoptotischen und nekrotischen neuronalen Tod, der durch hypoxische Ischämie induziert wird, sowie die Wirkungen von 75% Xenon und 33°C Hypothermie auf einen derartigen Zelltod bei 24 h in (A) dem Cortex und (B) dem Gyrus. In beiden Gehirnregionen bewirkt Xenon einen signifikanten Anstieg des Prozentanteils lebensfähiger Zellen aufgrund einer verringerten nekrotischen Zellzahl. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  gegenüber Positivkontrollen.

[0121] [Fig. 16](#) zeigt, dass Xenon bei 48 h über einen anti-apoptotischen Mechanismus neuroprotektiv wirkt. Spezifischer ausgedrückt, zeigt [Fig. 16](#) Diagramme für den apoptotischen und nekrotischen neuronalen Tod, der durch hypoxische Ischämie induziert wird, sowie die Wirkungen von 75% Xenon und 33°C Hypothermie auf einen derartigen Zelltod bei 48 h in (A) dem Cortex und (B) dem Gyrus. Xenon wirkt über einen anti-apoptotischen Mechanismus sowohl im Cortex als auch im Gyrus neuroprotektiv.

Zusätzlich besitzt Xenon eine anti-nekrotische Wirkung im Cortex. Eine Hypothermie von 33°C scheint in beiden Gehirnregionen neuroprotektiv zu wirken, jedoch durch einen unterschiedlichen Mechanismus – sie ist anti-nekrotisch im Cortex und anti-apoptotisch im Gyrus. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm SD(n = 3)$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber Positivkontrollen.

[0122] [Fig. 17](#) zeigt, dass eine Kombination von Xenon und Hypothermie synergistisch interagiert, um eine anti-apoptotische Neuroprotektion zu bewirken. Spezifischer ausgedrückt, zeigt [Fig. 17](#) Diagramme für den apoptotischen und nekrotischen neuronalen Tod, der durch hypoxische Ischämie induziert wird, und die Wirkung einer Kombination aus 20% Xenon und 35°C Hypothermie auf einen solchen Zelltod bei 16, 24 und 48 h in (A) dem Cortex und (B) dem Gyrus. Es war kein Unterschied zu sehen, wenn man die 20% Xenongruppe und die 35°C Hypothermiegruppe mit den Positivkontrollen verglich, d. h. bei diesen Werten gab es keine Neuroprotektion. Wenn diese Werte jedoch in Kombination verwendet werden, gab es einen dramatischen Anstieg des Prozentanteils lebensfähiger Zellen aufgrund einer signifikanten Abnahme der Zahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Positiv-Kontrolltieren. Im Gyrus stellte die Kombination eine zusätzliche anti-nekrotische Wirkung bei 24 h bereit. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm SD(n = 3)$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber Positivkontrollen.

[0123] Eine detailliertere Diskussion dieser Figuren ist im folgenden Beispielabschnitt zu finden.

#### BEISPIELE

##### BEISPIEL 1

###### Modell der neonatalen Asphyxie

[0124] Sieben Tage alte, postnatale Sprague-Dawley-Ratten wurden unter chirurgischer Betäubung (1%–1,5% Isofluran in reinem Sauerstoff) dem Abbinden der rechten Halsschlagader unterzogen. Nach dem Abbinden wurden die Tiere zu ihren Müttern zurückgebracht und in einen speziell gestalteten Bereich mit konstanter Raumtemperatur (23°C) und Luftfeuchtigkeit (48%) gesetzt. Einen Tag nach der Chirurgie wurden die neugeborenen Ratten in eine speziell gestaltete Kammer mit 8% Sauerstoff in Kombination mit 0, 20, 40, 60 oder 70% Xenon (mit Stickstoff als Restanteil) für 90 min bei 37°C gesetzt (die Temperatur wurde durch ein außen an der Kammer vorbeilaufendes Wasserbad gehalten). Am post-experimentellen Tag 7 wurden die Ratten (14 Tage alt) getötet, und ihre Gehirne wurden entnommen. Das Verhältnis des Gewichts der rechten gegenüber der linken Hemisphäre (R/L-Verhältnis) wurde berechnet. Rattenbabys in einigen Gruppen ließ

man für bis zu 30 Tage des postnatalen Alters leben, wobei zu dieser Zeit ihre neuromotorische Funktion und Koordination mittels etablierter Protokolle bestimmt wurde (neuromotorischer Test und Drehstabtest).

[0125] Die Ergebnisse zeigten, dass bei zunehmenden Zeiten der Hypoxie eine Schädigung (wie gemessen durch den Verlust an Hirngewicht) nur dann offenkundig wurde, wenn die Hypoxie 90 Minuten überschritt ([Fig. 1](#)). Somit wurde die Standardzeitspanne der hypoxischen Verletzung auf 90 Minuten festgelegt.

[0126] Gehirnschnitte von Tieren, die 90 Minuten der Hypoxie-Ischämie-Verletzung erlitten, sind in [Fig. 2](#) dargestellt. In größerem Detail zeigt [Fig. 2](#) (Zentrum) eine schwere anatomische Schädigung (an der Hirnseite, die die Verletzung erlitt – linke Seite in dieser Ansicht), wenn man dies mit Kontrolltieren (links) verglich. Die Hirnschnitte auf der rechten Seite stammen von Tieren, die die gleiche Hypoxie-Ischämie erlitten haben, jedoch während der hypoxischen Zeitspanne 70% Xenon einatmeten. Diese Gehirne sehen nahezu normal aus, was die bemerkenswerte Neuroprotektion zeigt, die von Xenon erbracht wird.

[0127] Der wesentliche zelluläre Schaden, der 24 Stunden nach 90-minütiger Hypoxie-Ischämie erkennbar ist, ist in [Fig. 3](#) gezeigt.

[0128] Die Konzentrationsabhängigkeit der Neuroprotektion durch Xenon (Verhältnis von rechtem Hemisphärenge wicht/linkem gegenüber der Xenonkonzentration) ist in [Fig. 4](#) gezeigt. In größerem Detail zeigt [Fig. 4](#) die Verhältnisse von ipsilateralem/contralateralem Hemisphärenge wicht im 14-Tage-alten Rattenhirn nach Hypoxie/Ischämie mit oder ohne verschiedene Konzentrationen an Xenon im Alter von 7 Tagen. Die Neuroprotektion ist selbst bei subanästhetischen Konzentrationen offenkundig. Bei den Kontrolltieren wurde die Halsschlagader abgebunden, jedoch wurde keine Hypoxie verabreicht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm SEM(n = 5 – 8)$ . \* $P < 0,01$  gegenüber 8% O<sub>2</sub>.

[0129] Die Wirkung von 70% Xenon auf die neurologischen Funktionen, bestimmt längere Zeit nach dem hypoxisch-ischämischen (HI) Krankheitereignis, ist in [Fig. 5](#) dargestellt. Am postnatalen Tag 7 wurde die rechte Halsschlagader abgebunden, und die Rattenbabys wurden für 90 min einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt (8% Sauerstoff + 70% Xe, Restanteil Stickstoff). Dreißig Tage nach dem Krankheitereignis wurden die Ratten im Hinblick auf ihre neuromotorische Funktion bewertet, dies unter Verwendung von (A) einer Palette, beinhaltend Tests der Griffbewegung, -Stärke und der Schwebebalkenleistung (bewertet nach einer Skala von 0–9), und (B) dem Gleichgewicht auf einem Drehstab, ein Stan-

dardtest des Gleichgewichts und der neuromotorischen Funktion. Der Datenpunkt einer einzelnen Ratte ist die Summe von drei Tests. Die horizontalen Balken zeigen den Mittelwert für jede Gruppe an.

**[0130]** Die neuroprotektive Wirkung (Verhältnis von rechter Hemisphäre zur linken), beobachtet mit N<sub>2</sub> bzw. Xenon, ist in [Fig. 6](#) gezeigt, wenn Xenon 2 Stunden nach dem HI-Ereignis verabreicht wird. In größerem Detail zeigen die Daten, dass Xenon wirksam ist, eine Neuroprotektion bereitzustellen, selbst wenn es 2 Stunden nach dem Ende der hypoxischen Phase verabreicht wird. Dargestellt sind die Verhältnisse des ipsilateralen/contralateralen Hemisphärenge wicht im 14 Tage alten Rattenhirn nach 90 min des hypoxisch-ischämischen Krankheitsereignisses und dann 2 Stunden Erholungsphase, gefolgt von der Exposition gegenüber 70% N<sub>2</sub> oder 70% Xe + 30% O<sub>2</sub> für 90 min bei 7 Tage alten Tieren. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ±SEM(n = 6).

**[0131]** Die Wirkung von milder Hypothermie auf die neuroprotektive Wirkung von Xenon (LDH-Freisetzung gegenüber der Xenon-Konzentration, % atm) ist in [Fig. 7](#) dargestellt. Eine mäßige Hypothermie erzeugt eine sehr große und unerwartete Steigerung der Neuroprotektion durch Xenon. Die Abkühlung um 4 Grad steigert stark die Wirkung von Xenon beim Blockieren der LDH-Freisetzung. In größerem Detail zeigt diese Figur die Wirkung einer Kombination aus Xenon und Hypothermie auf die durch Sauerstoff-Glukose-Verknappung (OGD) induzierte Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH). [Fig. 7](#) zeigt die Ergebnisse der Exposition neuronaler Kulturen gegenüber 75 Minuten OGD in Gegenwart steigender Konzentrationen an Xenon, entweder bei 37°C (rot) oder bei 33°C (blau). Die ED<sub>50</sub>-Werte für Xenon bei 37°C gegenüber Xenon bei 33°C betragen 35,9 +/- 2,15% bzw. 11,5 +/- 2,0% (Mittelwert ±SEM). Die neuronale Verletzung wird als ein Prozentsatz der maximalen LDH-Freisetzung nach 75 Minuten OGD und 6 Stunden Erholung in Abwesenheit entweder von Xenon oder Hypothermie ausgedrückt. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte, mit Fehlerbalken, die die Standardfehler anzeigen.

**[0132]** Das Ausmaß der Temperaturabhängigkeit des Prozesses ist in [Fig. 8](#) gezeigt, die eine van't Hoff-Auftragung des natürlichen Logarithmus der LDH-Freisetzung, aufgetragen gegen die reziproke absolute Temperatur, darstellt. Aus der Steigung einer solchen Auftragung kann die Enthalpie-Veränderung des Prozesses berechnet werden, wobei deren Größe ein Maß für die Temperaturabhängigkeit ist. Die in rot dargestellten Daten zeigen die Wirkung der Temperatur auf die LDH-Freisetzung in Abwesenheit von Xenon. Die Reduzierung der Freisetzung bei Reduzierung der Temperatur ist erwartet, aber mäßig. Wenn 12,5% Xenon anwesend sind, ist die Temperaturabhängigkeit sehr groß und unerwartet. Hypother-

mie scheint daher die neuroprotektiven Wirkungen von Xenon in hohem Maße zu verstärken. Dementsprechend legen die Ergebnisse nahe, dass Hypothermie und Xenon synergistisch als neuroprotektive Mittel wirken.

**[0133]** Detailliertere Studien sind in Beispiel 2 unten dargestellt.

## BEISPIEL 2

### MATERIALIEN & METHODEN

**[0134]** Diese Studie ist konform mit dem United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act von 1986 und wurde durch das Home Office (U.K.) genehmigt.

#### Tiermodell der Hypoxie-Ischämie

**[0135]** Diese Studie verwendete ein 7-Tage-altes (p7) Rattenmodell der fokalen HI, bei dem das Muster der Hirnverletzung demjenigen der hypoxisch-ischämischen Verletzung beim zeitlich normal geborenen menschlichen Neugeborenen ähnelt (Johnston, 1983).

**[0136]** p7-Sprague-Dawley-Rattenbabys (Gewicht zwischen 10 und 14 g) von Harlan, U.K., wurden einem zuvor beschriebenen Modell der HI-Verletzung (Levine, 1960; Rice et al, 1981) unterworfen. Kurz dargestellt, wurden die Rattenbabys mit 2% Isofluran betäubt, bevor sie dem dauerhaften, unilateralen Abbinden der rechten Halsschlagader unterzogen wurden, wobei hierfür ein Mittellinien-Halseinschnitt und 5,0 Seidennahtmaterial verwendet wurden. Sobald die Operation abgeschlossen war, wurden die Babys aus der Betäubung aufgeweckt und wurden bis zum Zeitpunkt des Versuchs zum Muttertier zurückgebracht.

**[0137]** 1 Stunde nach der Chirurgie wurden die Babys der Hypoxie ausgesetzt, indem man sie in zweckgerichtet konstruierte, luftdichte Kammern einsetzte, die partiell in ein 37°C-Wasserbad eingetaucht wurde ([Fig. 9](#)). Es wurde eine hypoxische Zeitspanne von 90 Minuten gewählt, da vorherige Experimente angezeigt hatten, dass hypoxisch-ischämische Schädigung, wie gemessen durch das Hemisphärenge wicht, nach dieser Zeitspanne maximal ist. Die Hypoxie wurde durch einen kontinuierlichen Fluss von feuchtem 8%igem Sauerstoff mit Stickstoff als Restanteil induziert, und dieses Gemisch wurde alle 15 Minuten durch einen Datex Ohmeda (Bradford, U.K.) überwacht. (Alle Gase wurden von BOC bereitgestellt.)

#### Experimentelle Behandlungen

**[0138]** Nach der HI wurden die Babys für 4 Stunden

zur Erholung zu den Muttertieren zurückgesetzt, wodurch sie für 90 Minuten einer der unten genannten experimentellen Behandlungen unterzogen wurden. Daten aus früheren Experimenten zeigten, dass die optimale Zeit, bei der die Intervention anzuwenden ist, entweder gleichzeitig mit der HI oder 4 Stunden danach war. Es existierte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zeitspannen, und somit wurde 4 h nach dem Krankheitsereignis als der Zeitpunkt ausgewählt, um die Intervention anzuwenden, da dieser für am klinisch relevantesten gehalten wurde.

**[0139]** Die Babys wurden für 16, 24 und 48 Stunden nach der Behandlung zu ihren Müttern zurückgesetzt, bevor sie getötet wurden (Northington et al., 2001) ([Fig. 10](#)).

#### Kontrollen

**[0140]** Die Kontrollgruppen bestanden aus (a) unbehandelten Geschwistertieren, bei denen ein Einstich, jedoch kein Abbinden vorgenommen wurde (d. h. scheinbehandelte Tiere), verwendet als Negativkontrollen, und (b) Geschwistertieren, die HI, nicht jedoch der experimentellen Intervention ausgesetzt wurden, um als Positivkontrollen zu dienen. Diese Tiere wurden 90 Minuten bei 37°C und einem Gasgemisch, zusammengesetzt aus 25% Sauerstoff und Stickstoff als Restanteil, ausgesetzt.

#### Versuchsratten

**[0141]** Bei den Versuchsratten war es nach HI und der Erholung so, dass die Versuchsratten 90 Minuten lang mit einer der fünf unten dargestellten experimentellen Interventionen behandelt wurden. Jede der fünf Behandlungen wurde bei einer separaten Gruppe von Ratten durchgeführt.

#### Behandlung mit Hypothermie

**[0142]** Die Rattenbabys machten 90 Minuten der Behandlung mit milder Hypothermie (33°C) durch. Ein Baby wurde zufällig ausgewählt, und unter Isofluran und lokaler Betäubung wurde eine Temperatursonde (Mini-Mitter Co. Inc., Bend, OR, USA) in den Cortex eingeführt und mit einem Superklebstoff in Position gehalten. Alle Babys wurden dann in die luftdichten Kammern (wie zuvor) eingebracht, und ein Gemisch aus 25% Sauerstoff und Stickstoff als Restanteil wurde hindurchgepumpt. Die Kammern wurden teilweise in ein Wasserbad eingetaucht, das so aufrechterhalten wurde, dass es die Kortikaltemperatur der Babys auf exakt 33°C hielt, wie gemessen durch die Temperatursonde und die Vital View Computersoftware. Diese Temperatur wurde so ausgewählt, dass sie „milde“ Hypothermie repräsentiert und wurde somit als klinisch bedeutsam eingestuft, da sie ein gutes Gleichgewicht zwischen Nebenwir-

kungen und Nutzen bereitstellt. Nach 90-minütiger Behandlung erhielten die Babys eine Erholungsphase bei ihrer Mutter, bis sie getötet wurden. Das Baby mit der in Position befindlichen Temperatursonde wurde unmittelbar nach dem Versuch ausgesondert, und sein Gehirn wurde nicht für die Analyse verwendet.

#### Behandlung mit Xenon

**[0143]** Für die Behandlung mit Xenon folgte man dem gleichen experimentellen Muster, jedoch wurde anstelle der Hypothermie das Wasserbad auf 37°C gehalten, und das Gasgemisch wurde für 90 Minuten durch 25% Sauerstoff plus 75% Xenon ersetzt. Das Gas wurde einem zweckgemäß konstruierten geschlossenen System zugeführt, um ein Austreten von Xenon zu minimieren ([Fig. 9](#)). Wiederum wurden die Babys, bis sie getötet wurden, zu ihren Müttern zurückgesetzt.

#### Kombinationsprotokoll

**[0144]** Bei dem Kombinationsbeispiel wurden die Ratten sowohl der Hypothermie als auch Xenon gleichzeitig für 90 Minuten unterzogen. Wiederum wurden die Babys in luftdichte Kammern eingesetzt, jedoch wurden die Temperaturen bei dieser Gelegenheit auf 35°C gehalten, und das Gasgemisch bestand aus 25% Sauerstoff, nur 20% Xenon und Stickstoff als Restanteil. Für diese Temperatur und Xenonkonzentration wurde in vorherigen Versuchen gezeigt, dass sie dem sich entwickelnden Gehirn keinen neuroprotektiven Nutzen verleiht, wenn sie unabhängig voneinander verwendet werden. Somit ist durch die Verwendung dieser Werte jedweder neuroprotektive Nutzen ein Zeichen von Synergie zwischen den beiden Mitteln. Nach der Behandlung wurden die Babys zu ihren Müttern zurückgebracht, bis sie getötet wurden.

**[0145]** Um zu zeigen, dass die in der Kombinationsgruppe verwendeten Werte keine Neuroprotektion verliehen, wenn sie unabhängig voneinander verwendet wurden, wurden zwei weitere Gruppen von Versuchsratten verwendet: eine Gruppe machte die Hypothermie (wie zuvor) bei 35°C durch, und die andere Gruppe wurde Xenon bei einer Konzentration von 20% ausgesetzt.

#### Gewebepräparation

#### Ernten des Gehirns

**[0146]** Die Gehirne wurden 16, 24 und 48 h nach dem Ende des Versuchsprotokolls entnommen.

**[0147]** Die Tiere wurden mit einer Überdosis an Pentobarbital (100 mg/kg) intraperitoneal getötet und dann mit 2,5 u/ml Heparin in PBS über transkardiale

Perfusion durch den linken Ventrikel von Blut befreit. Darauf folgte eine Perfusion mit 20 ml 4% Paraformaldehyd in PBS und nachfolgende Gehirnentnahme. Die Gehirne wurden über Nacht im gleichen Fixiermittel nachfixiert. Für jede Zeitgruppe war die Anzahl an Kontroll- oder Versuchsgehirnen gleichmäßig aufgeteilt, wobei diese entweder als Gefrierschnitte für die Immunhistochemie in Scheiben geschnitten oder für die histologische Analyse in Paraffin eingebettet wurden. Um zwischen den ipsilateralen und contralateralen Hemisphären zu unterscheiden, wurde eine Papierklammer verwendet, um ein Loch in der contralateralen, nicht betroffenen (linken) Hemisphäre zu erzeugen, bevor geschnitten wurde.

#### Paraffineinbettung

**[0148]** Nach dem Fixieren wurden die Gehirne für die Histologie unter Verwendung eines Histokinette 2000 Gewebeeinbettungsprozessors (Leica U.K., Ltd., Milton Keynes, U.K.) dehydriert und dann in Paraffin-Wachsblöcken eingebettet. Die in Paraffin eingebetteten Gehirne wurden unter Verwendung eines Mikrotoms (Leica, Deutschland) in Koronalschnitte mit einer Dicke von 5 µm geschnitten. [Fig. 10.3](#) veranschaulicht die Gehirnregion, aus der die Schnitte entnommen wurden. Es wurden etwa 20 Schnitte aus jedem Gehirn in der Region des Hippocampus entnommen (da dies die Region ist, die am empfindlichsten gegenüber HI-Verletzung ist), und zwar etwa –3,6 mm vom Bregma.

#### Gefrierschnitte

**[0149]** Sobald die Gehirne über Nacht nachfixiert worden waren, wurden sie in 30% Sucrose in PBS (enthaltend außerdem 2 mg/ml an Natriumazid) frostgeschützt und im Kühlschrank für 48 h oder bis sie auf den Boden des Röhrchens abgesunken waren, gelagert. Die Gehirne wurden dann in O.C.T.-Verbindung (BDH, Poole, England) bei –22°C gefroren, und es wurden Koronalschnitte von 30 µm auf einem Gleitkryostaten geschnitten (Bright Instrument Company Ltd., Huntingdon, U.K.). Die geschnittenen Gehirne wurden im Kühlschrank in Wells gelagert, die 0,1 M PBS und 1 mg/ml an Natriumazid enthielten, bevor sie für die Immunhistochemie angefärbt wurden (siehe unten).

#### Färbeprozeduren

#### Histologie

**[0150]** Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden auf Objekträger gebracht und mit Cresylviolett für die Histologie angefärbt, wie zuvor beschrieben (Wilhelm et al, 2002).

Neuropathologische Analyse von Nekrose und Apoptose

#### Histologische Mikroskopie

**[0151]** Die neuronale Verletzung wurde durch die histologische Analyse von Paraffin-Gehirnscheiben, die mit Cresylviolett angefärbt worden waren, bestimmt. Cresylviolett ist ein basischer Farbstoff, der an saure Komponenten des neuronalen Zytoplasmas, wie etwa RNA-reiche Ribosomen, und auch an die Zellkerne und Nukleoli der Nervenzellen, bindet. Diese Technik wurde verwendet, um die Zelllebensfähigkeit zu bestimmen, und ob nicht-lebensfähige Zellen Apoptose oder Nekrose auf Basis der validierten morphologischen Kriterien (Nakajima et al, 2000) zeigen.

**[0152]** Jede Versuchsgruppe bestand aus drei Zeitgruppen (16, 24, 48 h), und jede Zeitgruppe enthielt drei Tiere (somit waren neun Tiere insgesamt in jeder Versuchsgruppe). Es wurden pro Tier drei Scheiben aus der Hirnregion ausgewählt, die sich –3,6 mm vom Bregma befand ([Fig. 11](#)). Die Scheiben wurden dann in Zeitgruppen eingesortiert und für den Experimentator im Bezug auf die Intervention unkenntlich gemacht.

**[0153]** Zwei Regionen von der ipsilateralen Seite jedes Gehirns wurden unter Verwendung eines BX60-Lichtmikroskops (Olympus, Southall, U.K.) analysiert – eine im Cortex und eine im Gyrus des Hippocampus ([Fig. 11](#)). Es wurde eine 40x Objektivlinse mit einem Gitterchen verwendet, um die Gesamtzahl der Zellen, die in dem Gitter erschienen, auszuzählen. Die Zellen wurden aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbilds entweder als lebensfähig, apoptotisch oder nekrotisch einklassifiziert, und der Prozentanteil jedes Zelltyps wurde für jede der Gehirnregionen verzeichnet. Eine Axio-cam-Digitalkamera (Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurde zusammen mit dem Mikroskop verwendet, um Mikroskopiebilder der Gehirnschnitte aufzunehmen.

**[0154]** Die Kriterien der Zuordnung der Zellen zu jeder Kategorie waren wie folgt ([Fig. 12](#)):

1. Zellen, die einen der beiden Typen von Zelltod (Apoptose oder Nekrose) erlitten, nahmen die Cresylviolettfarbe intensiver auf als lebensfähige Zellen, die regelmäßig geformt und mit blassem Zytoplasma, sowie einem klar sichtbaren, dunklen Zellkern waren.
2. Zellen, die als apoptotisch einklassifiziert wurden, besaßen sehr dunkel gefärbte, geschrumpfte Zellkerne, die kugelig geformt waren, sowie eine intakte Zellmembran, oft mit einer umgebenden Region der Vakuolen-Bildung.
3. Nekrotische Zellen jedoch, obwohl ebenfalls sehr intensiv angefärbt, besaßen sehr unregelmäßig geformte, vergrößerte Zellkerne.

**[0155]** Die Anzahl apoptotischer, nekrotischer und lebensfähiger Zellen wurde als ein Prozentanteil der Gesamtzellzahl ausgedrückt und für jeden Objekträger vermerkt. Es wurde dann für jedes Tier ein mittlerer Prozentwert aus den drei Objekträgern berechnet, sodass jedes der drei Tiere in einer Zeitgruppe nur einen Wert besaß. Es wurde ein weiterer Mittelwert aus diesen drei Tieren bestimmt, um nur einen Wert für jede Zeitgruppe zu erhalten, und es wurde die Standardabweichung vermerkt.

#### Statistische Analyse

**[0156]** Die Datenanalyse wurde unter Verwendung eines Einweg-ANOVA, gefolgt von Student-Newman-Keuls, wo es passend war, durchgeführt. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

#### ERGEBNISSE

##### Xenon und Hypothermie als unabhängige Mittel

Xenon wirkt im Neugeborenen durch einen anti-apoptotischen Mechanismus neuroprotektiv

**[0157]** Die mikroskopische Analyse von Hirnregionen des Cortex und Hippocampus zeigte die neuroprotektiven Eigenschaften von Xenon durch das ähnliche morphologische Erscheinungsbild von mit Xenon behandelten Gehirnen im Vergleich zu scheinbehandelten Gehirnen, und den Unterschied im Erscheinungsbild, wenn man dies mit Gehirnen von Ratten verglich, die nicht mit Xenon behandelt wurden waren ([Fig. 14](#)). Durch die Verwendung von Xenon bei seiner Maximalkonzentration (75%) wurde eine tiefgreifende Neuroprotektion gegenüber hypoxischämischer Verletzung bei neugeborenen Ratten erreicht, und dies wurde mittels histologischer Analyse von mit Cresylviolett angefärbten Hirnscheiben quantifiziert. Die unabhängige Verwendung dieser Xenonkonzentration verringerte in signifikantem Maße den apoptotischen Zelltod und erhöhte die Zahl lebensfähiger Zellen. Nach 16 h war die Apoptose im Cortex von  $36,5\% \pm 2,5\%$  bei den Positivkontrollen auf  $8,5\% \pm 1,6\%$  ( $p < 0,001$ ) reduziert, und die Zahl lebensfähiger Zellen stieg von  $52,9\% \pm 2,3\%$  in Positivkontrollen auf  $80,6\% \pm 0,2\%$  ( $p < 0,001$ ) ([Fig. 13A](#)). Im Gyrus wurde die Apoptose von  $33,6\% \pm 1,8\%$  bei den Positivkontrollen auf  $13,9\% \pm 2,4\%$  ( $p < 0,01$ ) verringert, und die Anzahl lebensfähiger Zellen stieg von  $56,5\% \pm 2,6\%$  bei den Positivkontrollen auf  $77,1\% \pm 3,3\%$  ( $p < 0,01$ ) ([Fig. 13B](#)). Die 24 h- und 48 h-Gruppen ([Fig. 15](#) bzw. 16) zeigten ähnliche Ergebnisse wie die 16 h-Gruppe, wobei Xenon eine statistisch signifikante Anti-Apoptose zeigte, wenn man dies mit den Positivkontrolliertieren verglich, und zwar sowohl im Cortex als auch im Gyrus.

**[0158]** Für die Anti-Nekrose durch Xenon wurde ge-

zeigt, dass sie im Cortex nach 48 Stunden statistisch signifikant ist, wo es die Nekrose von  $16,6\% \pm 0,2\%$  bei den Positivkontrollen auf  $10,7\% \pm 0,4\%$  ( $p < 0,01$ ) verringerte ([Fig. 16A](#)). Xenon war jedoch im Gyrus bei 48 h nicht anti-nekrotisch ([Fig. 16B](#)). Bei allen anderen Zeitgruppen (16 h und 24 h) war Xenon nicht antinekrotisch.

90 Minuten der 33°C-Hypothermie nach moderater HI ist ineffektiv

**[0159]** Es wurde keine Neuroprotektion bei 33°C-Hypothermie nach 16 oder 24 h beobachtet ([Fig. 13](#) bzw. [Fig. 15](#)). Bei 16 h schien die Hypothermie eine signifikante anti-apoptotische Wirkung im Cortex zu haben, jedoch, da die Zahl lebensfähiger Zellen statistisch nicht verschieden gegenüber den Positivkontrolliertieren war, kann geschlussfolgert werden, dass diese Intervention keine Neuroprotektion bereitstellte. Bei 48 h jedoch wirkte Hypothermie über einen anti-nekrotischen Mechanismus im Cortex neuroprotektiv, reduzierte die nekrotische Zellzahl von  $16,6\% \pm 0,2\%$  bei den Positivkontrollen auf  $12\% \pm 2,3\%$  und steigerte die Anzahl lebensfähiger Zellen von  $43\% \pm 3,4\%$  auf  $52,3\% \pm 3,1\%$  ([Fig. 16A](#)). Im Gyrus war es bei 48 h so, dass Hypothermie Neuroprotektion in einer anti-apoptotischen Weise bereitstellte ([Fig. 16B](#)).

##### Xenon und Hypothermie in Kombination

Die Behandlung mit 20% Xenon alleine zeigt keine Neuroprotektion

**[0160]** Im Gegensatz zu den mit 75% Xenon erhaltenen Ergebnissen bietet 20% Xenon keine neuroprotektive Wirkung. Bei Betrachtung der [Fig. 17](#) ist zu sehen, dass der Prozentanteil an Apoptose, der sich im Cortex der 20% Xenon-Gruppe bei 16 h findet,  $36\% \pm 5,7\%$  beträgt, im Vergleich zu  $37\% \pm 2,5\%$  bei den Positivkontrolliertieren ( $p > 0,05$ ), und der Prozentanteil an Lebensfähigkeit  $51\% \pm 7,8\%$  im Vergleich zu  $53\% \pm 2,3\%$  beträgt ( $p > 0,05$ ) (d. h. es gibt keinen statistischen Unterschied zwischen der 20%-Gruppe und der Positivkontroll-Gruppe). Die Daten für den Gyrus erbrachten sehr ähnliche Ergebnisse.

Die Behandlung mit 35°C Hypothermie alleine zeigt keine Neuroprotektion

**[0161]** 35°C Hypothermie, die alleine verwendet wird, ist unwirksam gegen HI und zeigt keinen statistischen Unterschied in beiden der Hirnregionen, wenn man dies mit Positivkontrollen vergleicht. Der Prozentanteil an Apoptose beträgt  $48\% \pm 10,1\%$  gegenüber  $37\% \pm 2,5\%$  bei den Positivkontrollen, und der Prozentanteil der Zellebensfähigkeit beträgt  $44\% \pm 10,3\%$  gegenüber  $53\% \pm 2,3\%$ .

**[0162]** Die Behandlung mit einer Kombination aus

20% Xenon plus 35°C Hypothermie zeigt synergistische Neuroprotektion über einen anti-apoptotischen Mechanismus. Durch die Verwendung nachweislich unwirksamer Interventionen entweder mit Xenon (20%) oder Hypothermie (35°C) in Kombination wurde eine tiefgreifende synergistische Neuroprotektion in beiden Hirnregionen und über alle drei Zeitgruppen (16, 24 und 48 h) über einen anti-apoptotischen Mechanismus gezeigt. Eine post-ischämische Applikation der Kombinationsbehandlung reduzierte in signifikanter Weise das Ausmaß des apoptotischen Zelltods und steigerte den Anteil lebensfähiger Zellen (siehe **Fig. 17**). Nach 16 Stunden im Cortex wurde für die Reduzierung der Apoptose aufgrund der Kombinationstherapie herausgefunden, dass sich diese von  $35,8\% \pm 5,7\%$  und  $47,6\% \pm 10,1\%$  in der 20%-Xenon-Gruppe bzw. 35°C-Hypothermiegruppe auf nur  $7,2\% \pm 2\%$  in der Kombinationsgruppe belief ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ), wobei die lebensfähigen Zellen von  $51\% \pm 7,8\%$  und  $43,7\% \pm 10,3\%$  auf  $82,3\% \pm 4,9\%$  ( $p < 0,01$  in beiden Gruppen) gesteigert wurden. Die Daten für den Gyrus erbrachten ähnliche Ergebnisse (**Fig. 17B**), abgesehen von der 24 h-Gruppe, die einen anti-nekrotischen und ebenso einen anti-apoptotischen Schutz bereitzustellen schien.

**[0163]** In Anbetracht der Tatsache, dass von den einzelnen Mitteln keine Neuroprotektion bereitgestellt wurde, sind die Ergebnisse der Kombination erstaunlich und übertreffen das Erwartete sicher bei weitem. Das Ausmaß der Neuroprotektion, das durch die Kombination zweier einzeln unwirksamer Interventionen bereitgestellt wird, zeigt, dass *in vivo* zwischen Xenon und Hypothermie Synergie besteht.

#### LITERATURSTELLEN

Albers, G., Goldberg, M. P., Choi, D. W., 1989. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann Neurol* 25: 398–403.  
 Ankarcrona, M., 1995. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961–973.  
 Arias, R. L., Tasse, J. R. P., Bowlby, M. R., 1999. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an *in vitro* model of cerebral ischemia. *Brain Research* 816: 299–308.  
 Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., Cimino, M., 2000. Long-lasting behavioural alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research* 859: 318–325.  
 Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31–38.  
 Bosley, T. M., Woodhams, P. L., Gordon, R. D., Belazs, R., 1983. Effects of anoxia on the stimulated release of amino acid neurotransmitters in the cerebellum *in vitro*. *J. Neurochem* 40: 189–201.  
 Busto, R., Dietrich, W. D., Globus, M. Y. T., 1987.

Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Blood Flow Metab* 7: 729–738.  
 Choi, D. W., Koh, J-Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci* 8: 185–196.  
 Choi, D. W., Rothman, S. M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171–182.  
 Chopp, M., Knight, R., Tidwell, C. D., Helpman, J. A., Brown, E., Welch, K. M., 1989. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 141–148.  
 Chow, A., Ma, D., Hossain, M., Franks, N. P., Maze, M., 2003. Combined neuroprotection by xenon and hypothermia. *Society Neuroscience Abstract* 893 (1).  
 Clancy, B., Darlington, R. B., Finlay, B. L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neurosci* 105 (1): 7–17.  
 Cullen, S. C., Gross, E. G., 1951. The anaesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science* 113: 580–581.  
 Debillon, T., Daoud, P., Durand, P., Cantagrel, S., Jouvet, P., Saizou, C., Zupan, V., 2003. Whole-body cooling after perinatal asphyxia: a pilot study in term neonates. *Developmental Medicine and Child Neurology* 45: 17–23.  
 Dingledine, R., McBain, C. J., 1999. Glutamate and aspartate in: Siegel, S. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D., (Herausgeber), *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 6. Auflage, Lippincott-Raven, S. 316–333.  
 Eilers, H., Bickler, P. E., 1996. Hypothermia and Isoflurane similarly inhibit glutamate release evoked by chemical anoxia in rat cortical brain slices. *Anesthesiology* 85: 600–607.  
 Engelhard, K., Werner, C., Eberspächer, E., Bachl, M., Blobner, M., Eberhard, H., Hutzler, P., Eberhard, K., 2003. The effect of the  $\alpha$ 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 96: 524–531.  
 Erecinska, M., Nelson, D., Wilson, F., Silver, I. A., 1984. Neurotransmitter amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. *Brain Research* 304: 9–22.  
 Franks, N. P., Dickinson, R., de Sousa, S. L. M., Hall, A. C., Lieb, W. R., 1998. How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 396 (6709): 324.  
 Goto, T., Nakata, Y., Morita, S., 2003. Will xenon be a stranger or a friend? *Anesthesiology* 98: 1–2.  
 Goto, T., Saito, H., Nakata, Y., Uezono, S., Ichinose, F., Morita, S., 1997. Emergence times from xenon anaesthesia are independent of the duration of anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 79: 595–599.

- Graham, S. H., Shiraishi, K., Panter, S. S., Simon, E. P., Faden, A. I., 1990. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 110: 124–130.
- Gunn et al, 2000. *Curr Opin Pediatr*. Apr; 12 (2): 111-5.
- Gwag, B. J., Koh, J. Y., Demaro, J. A., Ying, H. S., Jacquin, M., Choi, D. W., 1997. Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neurosci* 77: 393–401.
- Hardingham, G. E., Bading, H., 2003. The yin and yang of NMDA receptor signalling. *Trends in Neuroscience* 26 (2): 81–89.
- Hauptman, M., Nelson, D., Wilson, D. F., Erecinska, M., 1984. Some changes in amino acid levels in rat brain synaptosomes during and after in vitro anoxia and simulated ischemia. *Brain Research* 304: 23–35.
- Hill, I. E., MacManus, J. P., Rasquinha, I., Tuor, U. I., 1995. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 676: 398–403.
- Homi, H. M., Yokoo, N., Ma, D., Warner, D. S., Franks, N. P., Maze, M., Grocott, H. P., 2003. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology* 99: 876–881.
- Ikeda, M., Nakazawa, T., Abe, K., Kaneko, T., Yamatsu, K., 1989. Extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus induced by ischemia is not calcium dependent in vitro and in vivo evidence. *Neurosci Lett* 96: 202–206.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff-Mueser, U., Tenkova, T., Diakranian, K., Olney, J. W., 2001. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical Pharmacology* 62: 401–405.
- Ikonomidou, C., Mosinger, J. L., Olney, J. W., 1989. Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. *Brain Research* 487: 184–187.
- Ikonomidou, C., Mosinger, J. L., Salles, K. S., 1989. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *J Neurosci* 9: 2809.
- Ikonomidou, C., Price, M. T., Mosinger, J. L., 1989. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J Neurosci* 9: 1693.
- Jevtic-Todorovic, V., Olney, J. W., 2003. Neuroprotective agents in: Evers, A. S., Maze, M., (Herausgeber), *Anesthetic Pharmacology: Physiological principles and clinical practice*, Churchill Livingstone, S. 557–572.
- Johnston, M. V., 1983. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 13: 511–518.
- Katja, C. Z., Green, D. R., 2001. How cells die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 108 (4): S99–S103.
- Kauppinen, R. A., McMahon, H., Nicholls, D. G., 1988. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>2+</sup>-concentration in isolated nerve terminals following in vitro hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience* 27: 175–182.
- Komuro, R. P., 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260: 95.
- Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, R., Delaney, R., Bremner, J. D., Heninger, G. R., Bowers, M. B., Charney, D. S., 1994. Subanaesthetic effects of the non-competitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199–214.
- Kudo, M., Aono, M., Lee, Y., Massey, G., Pearlstein, R. D., Warner, D. S., 2001. Effects of volatile anesthetics on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal glial cultures. *Anesthesiology* 95: 756–765.
- Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Experimental Cell Research* 239: 183–201.
- Levine, S., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1–17.
- Low, J. A., 1993. The relationship of asphyxia in the mature fetus to long-term neurologic function. *Clinical Obstetrics and Gynaecology* 36 (1): 82–90.
- Ma, D., Wilhelm, S., Maze, M., Franks, N. P., 2002. Neuroprotective and neurotoxic properties of the 'inert' gas, xenon. *British Journal of Anaesthesia* 89: 739–746.
- MacDonald, J. F., Schneiderman, J. H., Miljkovic, Z., 1986. Excitatory amino acids and regenerative activity in cultured neurons. *Adv Exp Med Biol* 203: 425.
- Mehmet, H., 2000. Caspases find a new place to hide. *Nature* 403: 29–30.
- Muir, K. W., Lees, K. R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26: 503–513.
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M. S., Gabrielson, K. L., Wilson, M. A., Martin, L. J., Blue, M. E., Johnston, M. V., 2000. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 20 (2): 7994–8004.
- Nakata, Y., Goto, T., Morito, S., 2001. Clinical pharmacology of xenon. *Int Anesthiol Clin* 39: 63–75.
- Nicholls, D. G., Budd, S. L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80: 315–360.
- Northington, F. J., Ferriero, D. M., Graham, E. M., Traystman, R. J., Martin, L. J., 2001. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiology of Disease* 8: 207–219.
- Olney, J. W., 2003. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology* 3: 101–109.
- Olney, J. W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D. F., Price, M. T., Sesma, M. A., 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254: 1515–1518.

- Onitsuka, M., Satoshi, M., Inokuchi, H., Shigemori, M., Higashi, H., 1998. Mild hypothermia protects rat hippocampal CA1 neurons from irreversible membrane dysfunction induced by experimental ischemia. *Neuroscience Research* 30: 1–6.
- Pellegrino-Giampietro, D. E., Cherici, G., Alesiana, M., Carla, V., Moroni, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced damage. *J. Neurosci* 10: 1035–1041.
- Perlman, J. M., 1999. Markers of asphyxia and neonatal brain injury. *NEJM* 341 (5): 364–365.
- Petzelt, C., Blom, P., Schmehl, W., Müller, J., Kox, W. J., 2003. Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon. *Life Sciences* 72: 1909–1918.
- Pohl, D., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., 1999. N-methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 96: 2508.
- Reinelt, H., Marx, T., Schirmer, U., Schmidt, M., 2001. Xenon expenditure and nitrogen accumulation in closed-circuit anaesthesia. *Anaesthesia* 56 (4): 309–311.
- Riccio, A., Ginty, D. D., 2002. *Nature Neurosci* 5 (5): 389–390.
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., Brierley, J. B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141.
- Rothman, S. M., Olney, J. W., 1986. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105–111.
- Sanders, R. D., Franks, N. P., Maze, M., 2003. Xenon: no stranger to anaesthesia. *BJA* 91 (5): 709–717.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W., MacDonald, J. F., Tymianski, M., 2000. Distinct roles of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 20 (1): 22–33.
- Shichino, T., Murakawa, M., Adachi, T., Miyazaki, Y., Segawa, H., Fukuda, K., Mori, K., 2002. Effects of xenon on acetylcholine release in the rat cerebral cortex in vivo. *British Journal of Anaesthesia* 88 (6): 866–868.
- Talbot, J. H., 1941. The physiologic and therapeutic effects of hypothermia. *N Eng J Med* 224: 281.
- Taylor, D. L., Mehmet, H., Cady, E. B., Edwards, A. D., 2002. Improved neuroprotection with hypothermia delayed by 6 hours following cerebral hypoxia-ischemia in the 14-day-old rat. *Ped Res* 51 (1): 13–19.
- Towfighi, J., Housman, C., Heitjan, D. F., Vannucci, R. C., Yager, J. Y., 1994. The effect of focal cerebral cooling on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Neuropathol (Berl.)* 87: 598–604.
- Treschera, W. H., Ishiwac, S., Johnston, M. V., 1997. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain and Development* 19: 326–338.
- Vannucci, R. C., 1997. Hypoxia-ischemia: Clinical Aspects in: Fanaroff, A. A., Martin, R. J., (Herausgeber), *Neonatal-perinatal medicine IV*, Mosby-Yearbook Inc, Philadelphia, S. 877–891.
- Vannucci, R. C., Connor, J. R., Mauger, D. T., Palmer, C., Smith, M. B., Towfighi, J., Vannucci, S. J., 1999. Mini-Review: Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neuro Res* 55: 158–163.
- Vannucci, R. C., Perlman, J. M., 1997. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 100 (6): 1004–1014.
- Volpe, 2001. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 7: 56–64.
- Wilhelm, S., Ma, D., Maze, M., Franks, N. P., 2002. Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury. *Anesthesiology* 96: 1485–1491.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251–306.
- Windle, WF, 1969. Brain Damage by Asphyxia at Birth. *Scientific American*, Oct; 221 (4): 76–84.
- Xu, L., Yenari, M. A., Steinberg, G. K., Giffard, R. G., 2002. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 21–28.
- Yager, J. Y., Asselin, J., 1996. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Stroke* 27: 919–926.

### Patentansprüche

1. Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von neonataler Asphyxie in einem neugeborenen Subjekt, wobei das Medikament für eine Verwendung in Kombination mit Hypothermie bestimmt ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Xenon mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Träger gemischt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Medikament gasförmig ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Medikament mittels Inhalation verabreicht werden soll.
5. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Xenon in Form eines 20- bis 70%-igen v/v-Gemischs aus Xenon/Luft verabreicht werden soll.
6. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Xenon mittels Perfusion verabreicht werden soll.
7. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Medikament die Form einer Flüssigkeit oder einer Lösung hat.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Me-

dikament die Form einer Lipidemulsion hat.

9. Verwendung nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, wobei das Medikament eine Form hat, die für eine intravenöse, neuraxiale oder transdermale Verabreichung geeignet ist.

10. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Xenon gleichzeitig mit, aufeinanderfolgend mit oder separat mit Hypothermie verabreicht werden soll.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Xenon gleichzeitig mit Hypothermie verabreicht werden soll.

12. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Xenon der Mutter des neugeborenen Subjekts vor der Geburt verabreicht werden soll.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Xenon der Mutter des neugeborenen Subjekts vor den oder während der Wehen verabreicht werden soll.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Xenon der Mutter des neugeborenen Subjekts für bis zu etwa 24 Stunden vor der Geburt verabreicht werden soll.

15. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Hypothermie für eine Zeitdauer von wenigstens etwa sechs Stunden nach dem hypoxisch-ischämischen (HI-)Krankheitsereignis aufrechterhalten werden soll.

16. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Hypothermie für eine Zeitdauer von etwa 6 bis etwa 24 Stunden nach dem hypoxisch-ischämischen (HI-)Zustand aufrechterhalten werden soll.

17. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Xenon in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht werden soll.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei das Xenon in einer subtherapeutisch wirksamen Menge verabreicht werden soll.

19. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Xenon in Kombination mit einem Anästhetikum, ausgewählt unter Isofluran, Sevofluran und Desfluran, verabreicht werden soll.

20. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das neugeborene Subjekt ein Säuger ist und die Temperatur des Säugers auf einer Temperatur von etwa 32°C bis etwa 36°C gehalten

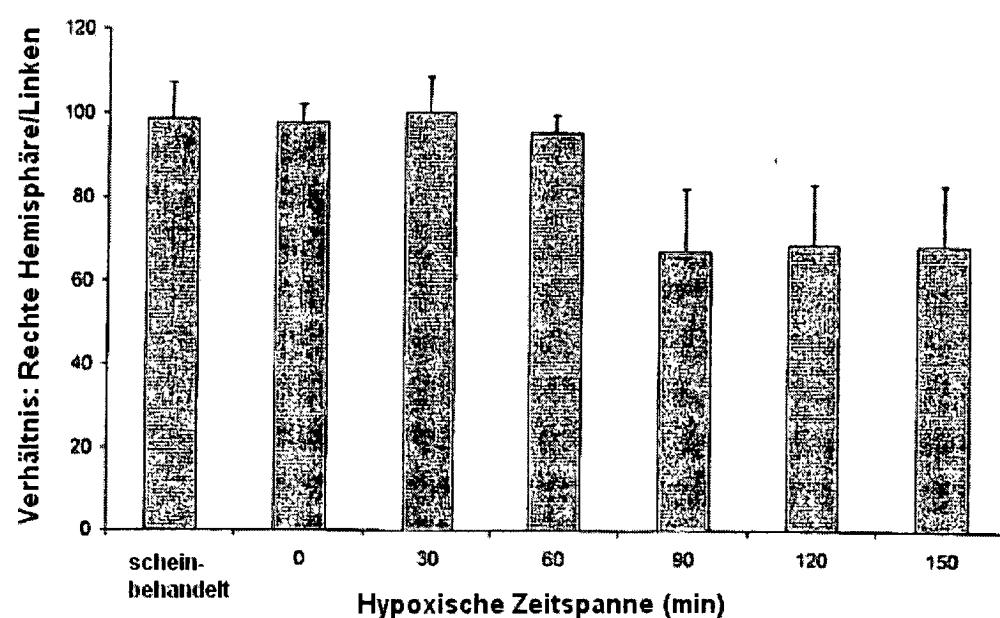
werden soll.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Temperatur des Säugers auf einer Temperatur von etwa 33°C bis etwa 35°C gehalten werden soll.

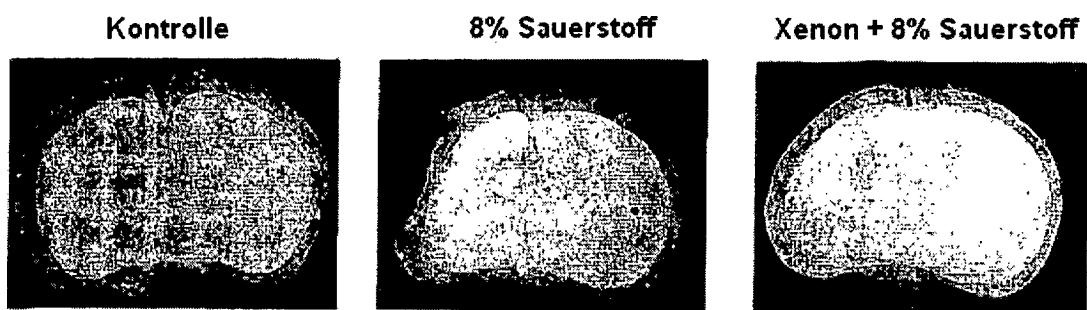
22. Verwendung von Xenon bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von neonataler Asphyxie, wobei die Behandlung die Verabreichung von Xenon in Kombination mit Hypothermie an ein Subjekt gleichzeitig, aufeinanderfolgend oder getrennt voneinander umfaßt.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

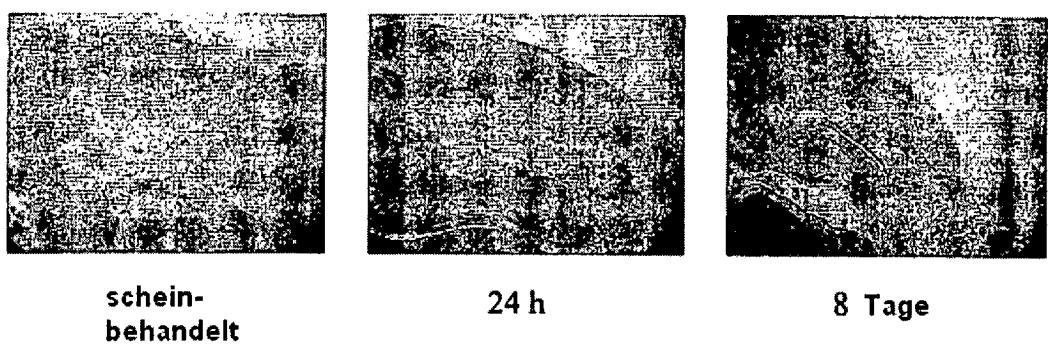
Anhängende Zeichnungen



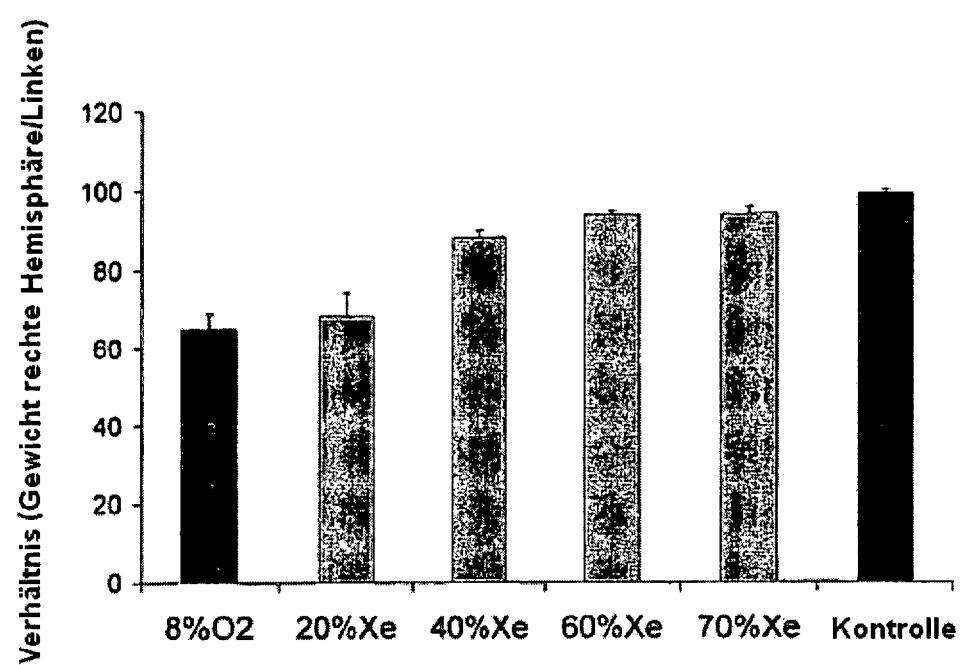
FIGUR 1



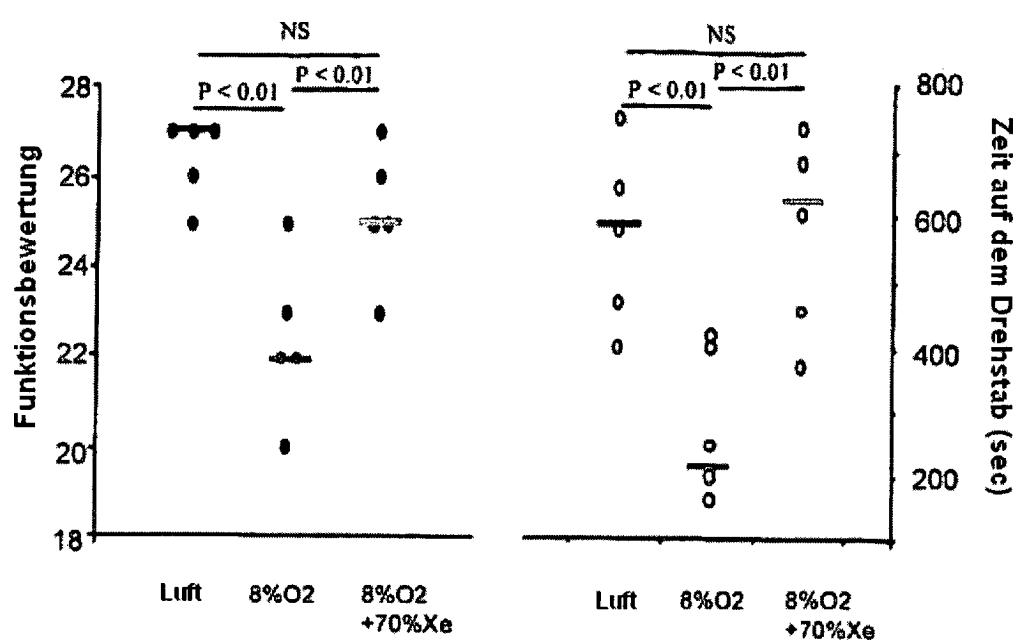
FIGUR 2



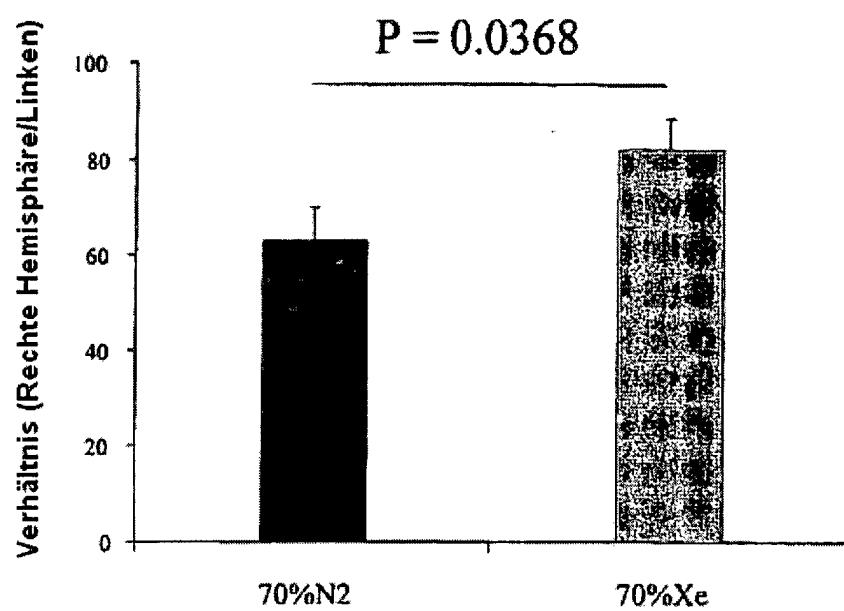
FIGUR 3



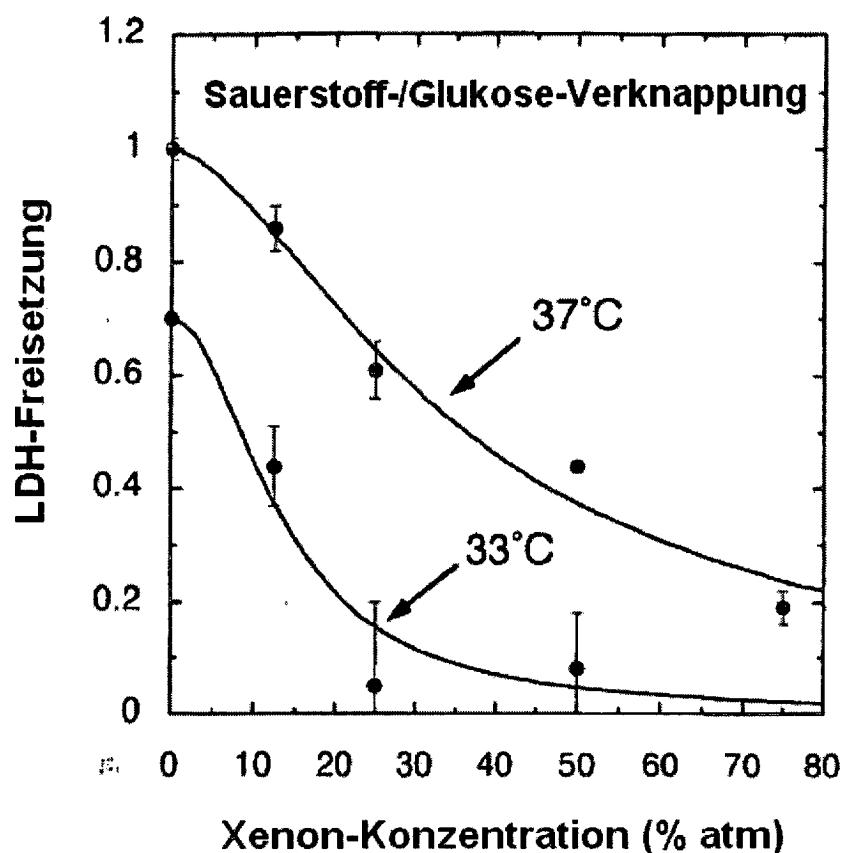
FIGUR 4



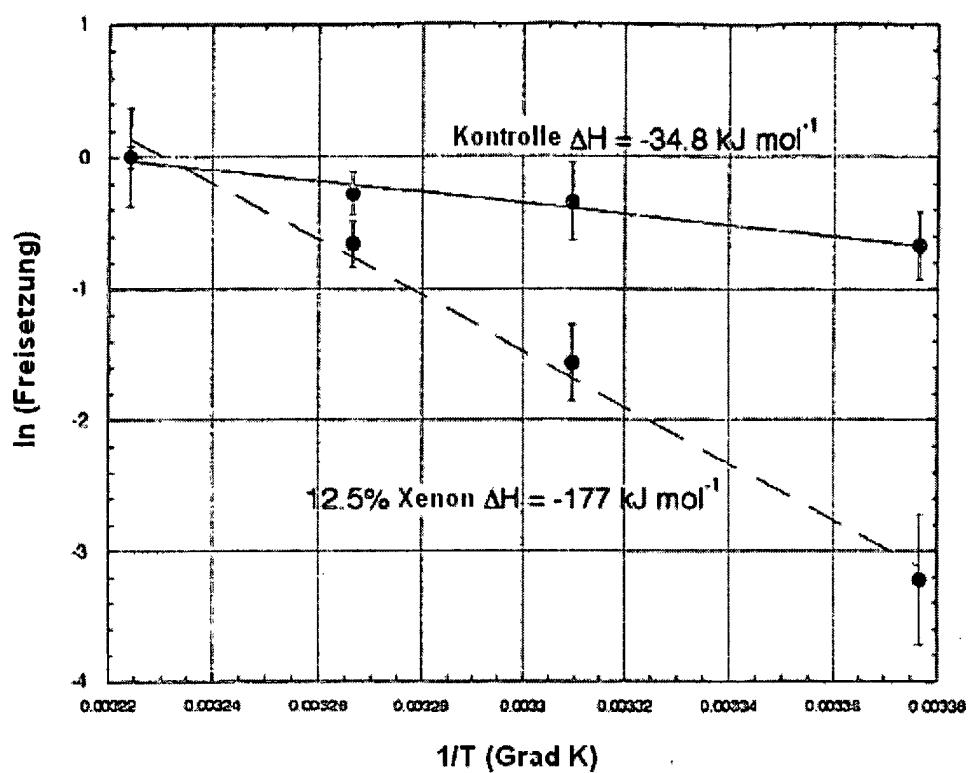
FIGUR 5



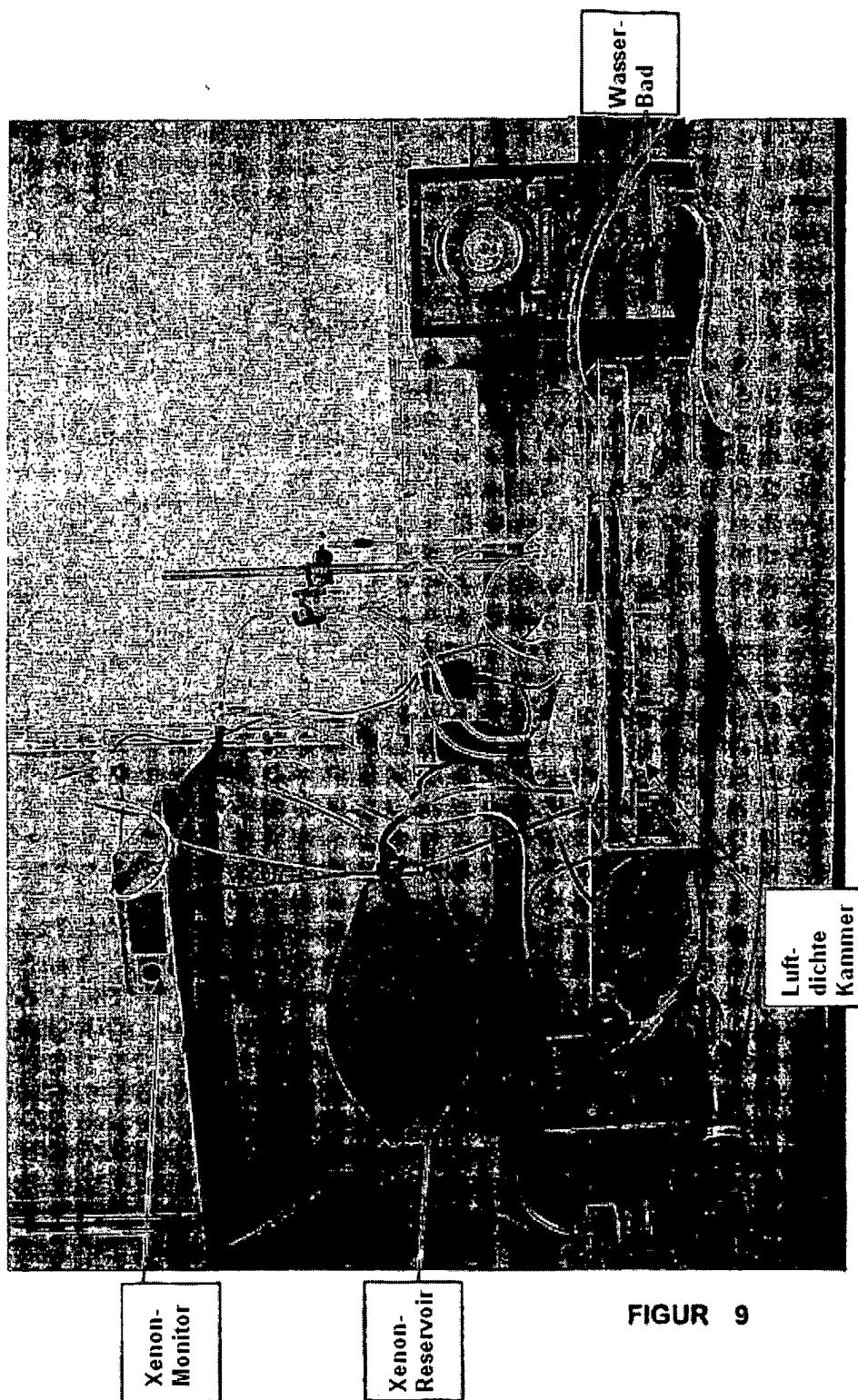
**FIGUR 6**



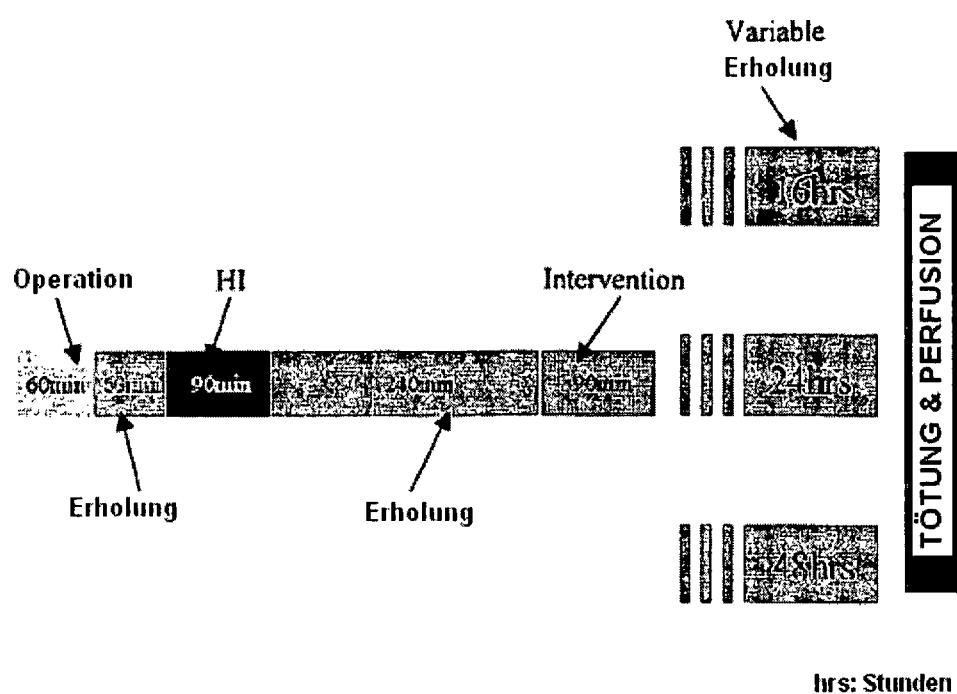
FIGUR 7



FIGUR 8

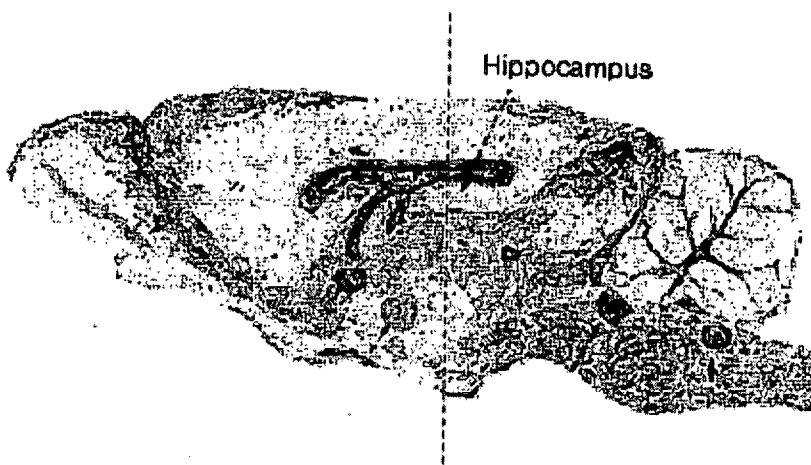


FIGUR 9

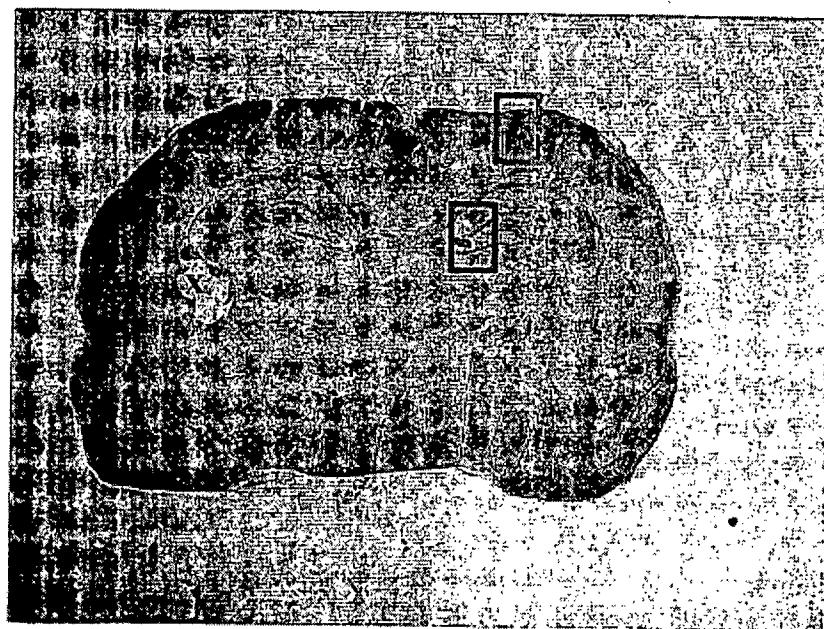


FIGUR 10

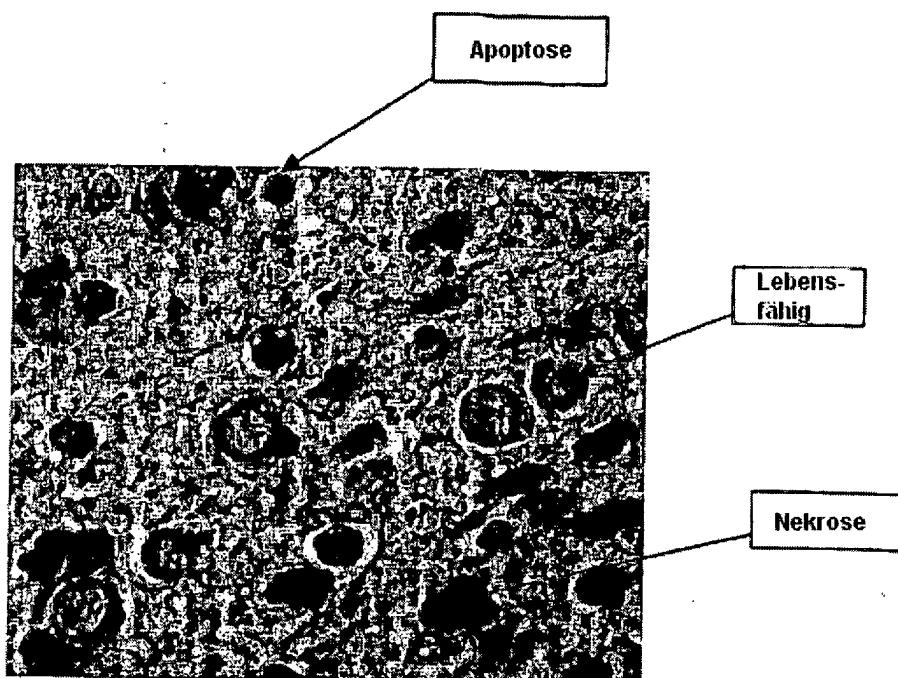
A.



B.

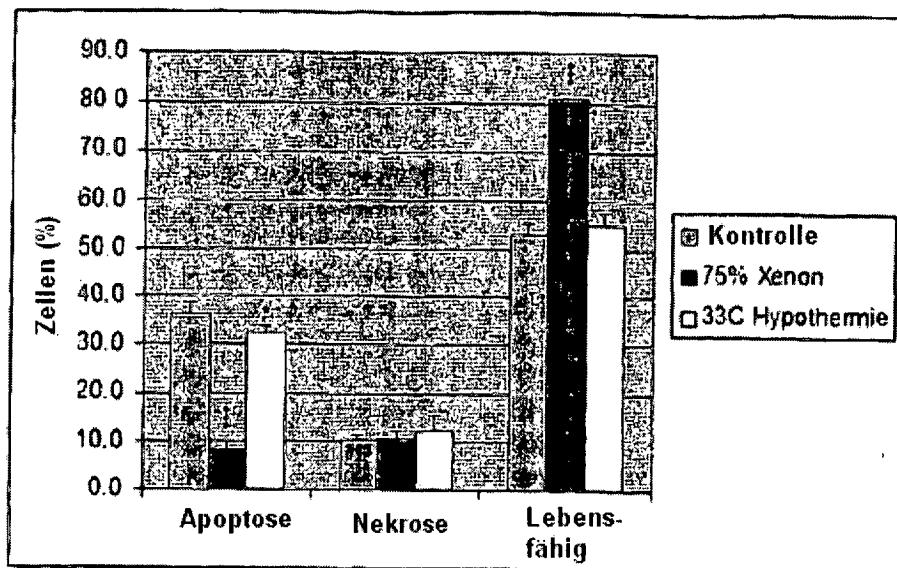


**FIGUR 11**

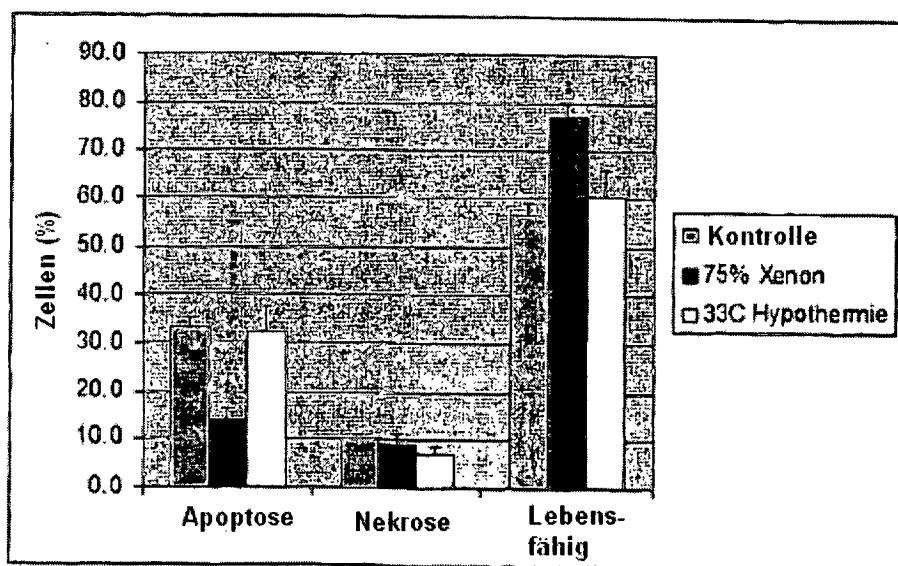


FIGUR 12

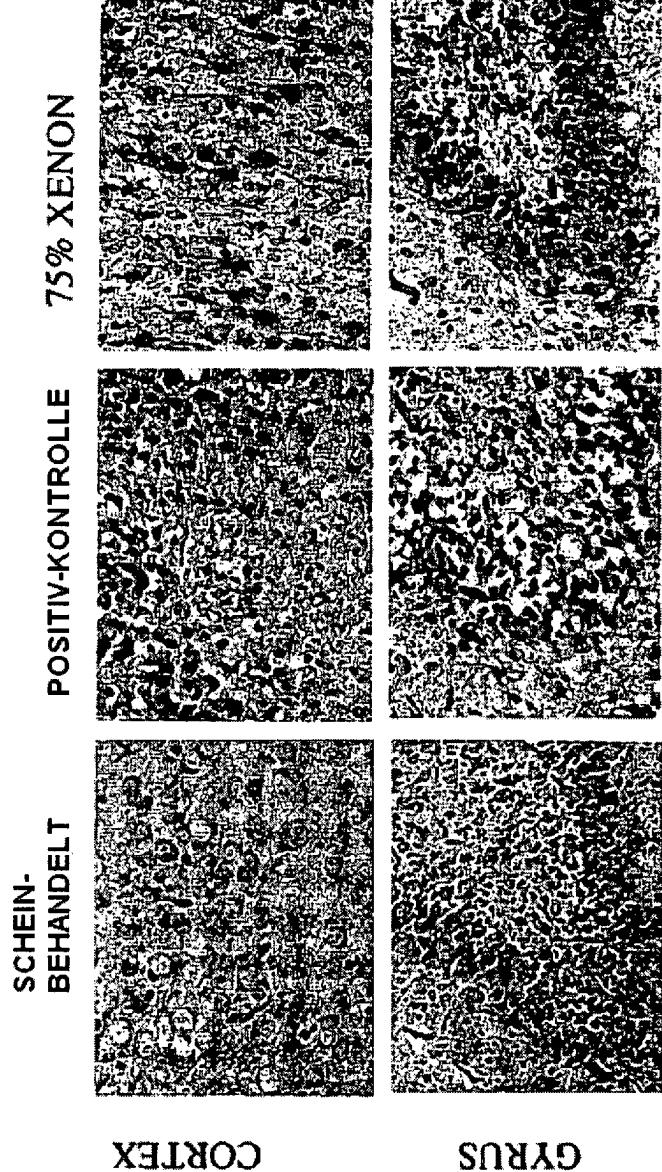
A.



B.

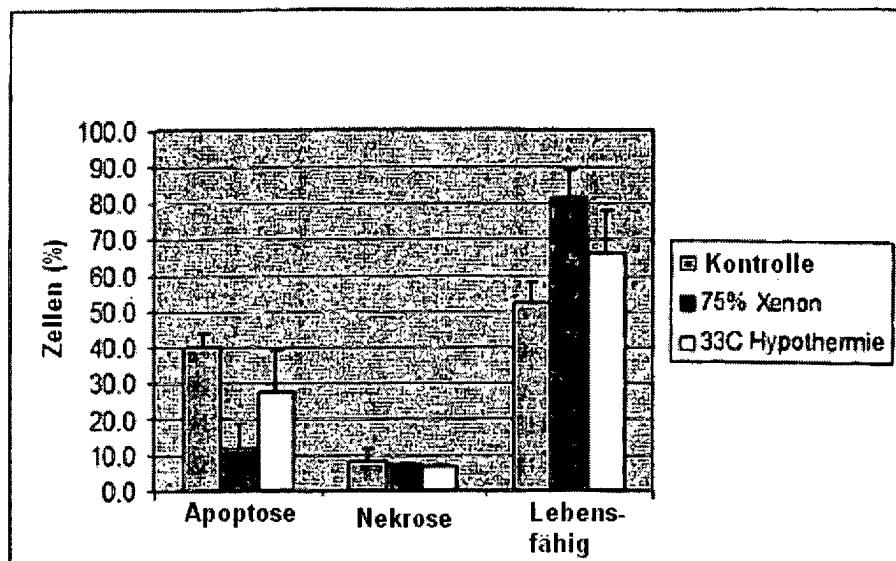


FIGUR 13

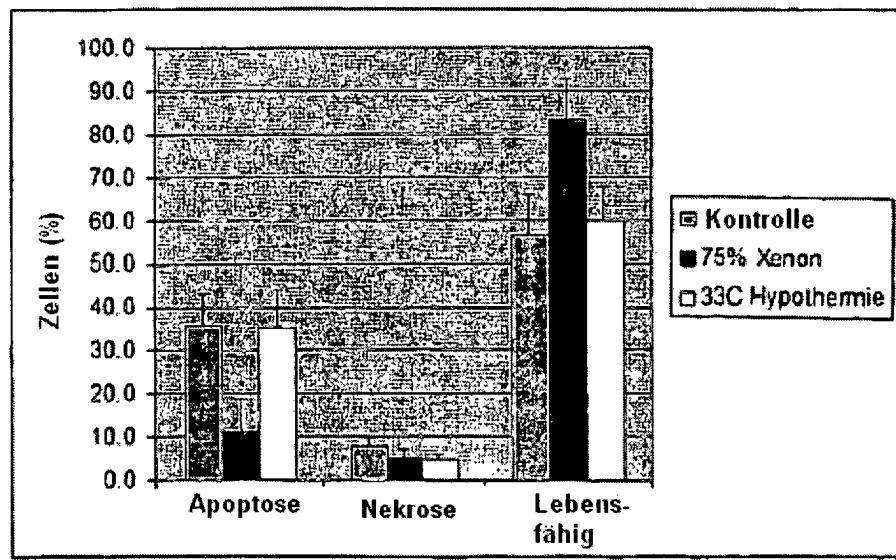


FIGUR 14

A.

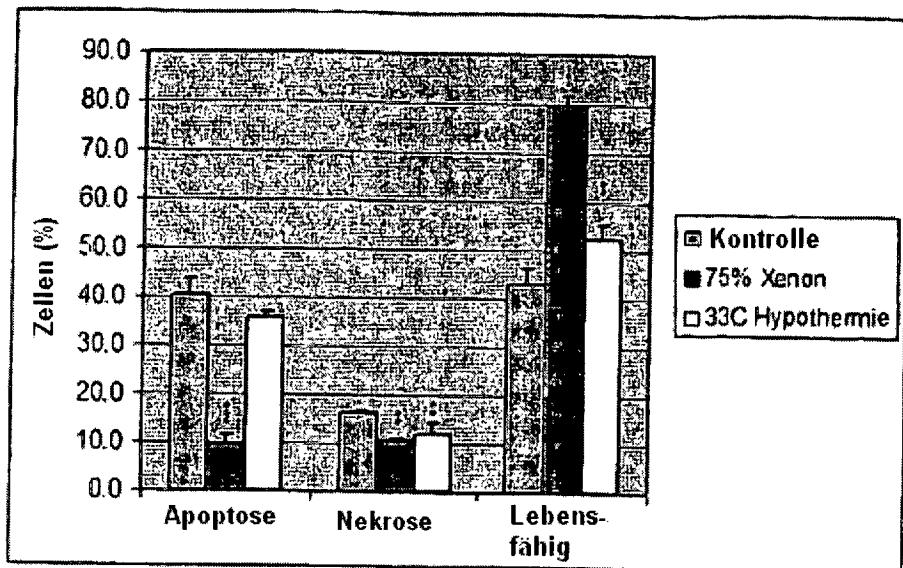


B.

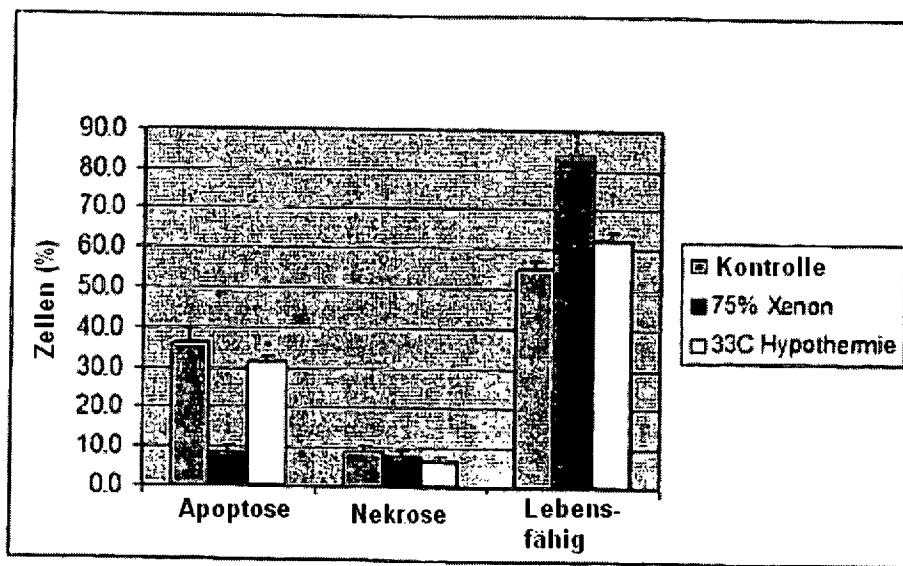


FIGUR 15

A.

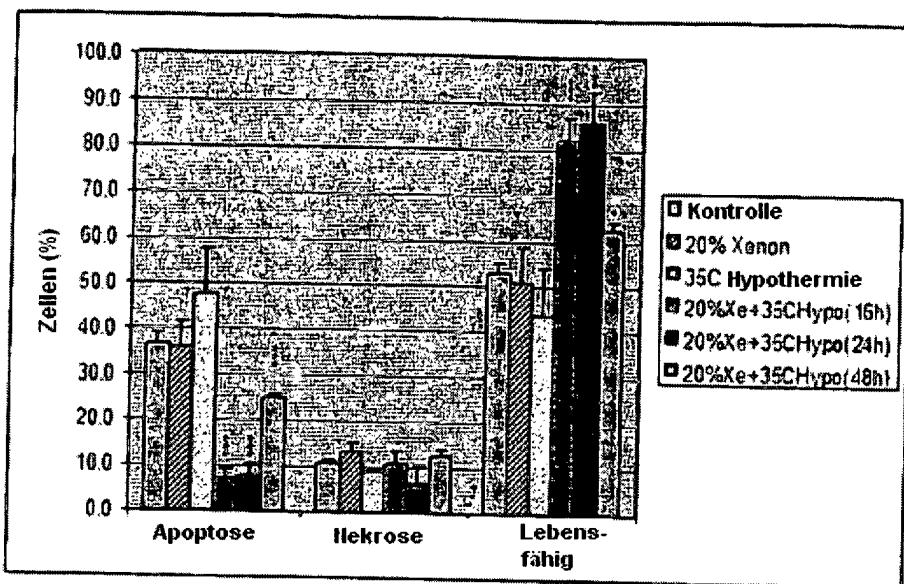


B.

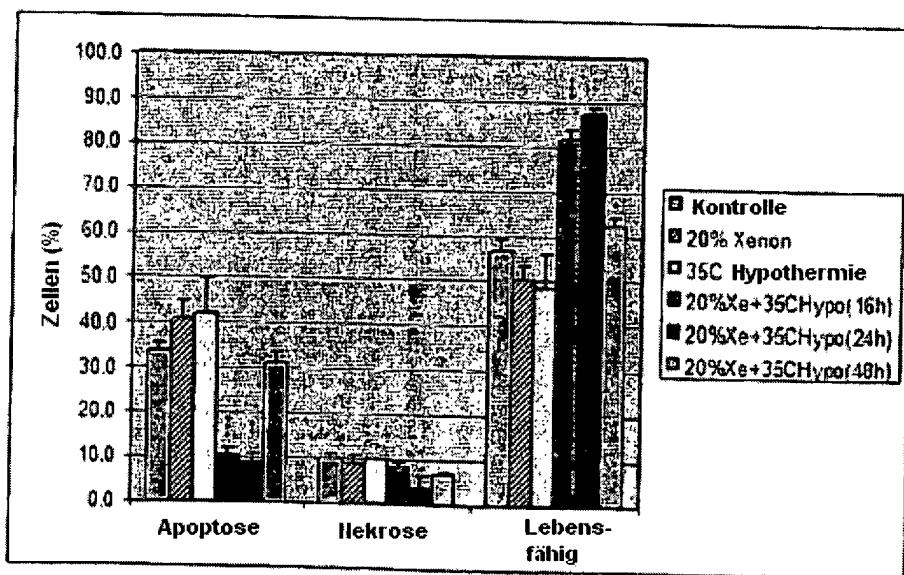


FIGUR. 16

A.



B.



FIGUR 17