

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs)
und
aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen
Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von
Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der adulten Ratte nach inkompletter globaler
zerebraler Ischämie und deren Beeinflussung durch Sevofluran**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Julia Kluge
aus
München

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. P. Kölle

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Mutter und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
<u>2</u>	<u>Schrifttum</u>	3
<u>2.1</u>	<u>Das Gehirn (<i>Encephalon</i>)</u>	3
<u>2.2</u>	<u>Der Hippokampus</u>	4
<u>2.3</u>	<u>Stoffwechsel und Gefäßversorgung des Gehirns</u>	6
<u>2.4</u>	<u>Zerebrale Ischämie</u>	7
<u>2.4.1</u>	<u>Allgemeines</u>	7
<u>2.4.2</u>	<u>Pathophysiologie</u>	8
<u>2.4.3</u>	<u>Tiermodelle der globalen Ischämie</u>	9
<u>2.5</u>	<u>Stammzellen</u>	11
<u>2.5.1</u>	<u>Embryonale Stammzellen</u>	11
<u>2.5.2</u>	<u>Adulte Stammzellen</u>	12
<u>2.5.3</u>	<u>Adulte neuronale Stammzellen</u>	12
<u>2.5.4</u>	<u>Neurogenese nach zerebraler Ischämie</u>	16
<u>2.6</u>	<u>Inhalationsanästhetika Sevofluran und Halothan</u>	17
<u>2.6.1</u>	<u>Einführung</u>	18
<u>2.6.2</u>	<u>Sevofluran</u>	18
<u>2.6.2.1</u>	<u>Physikalische und chemische Eigenschaften</u>	18
<u>2.6.2.2</u>	<u>Pharmakokinetik</u>	19
<u>2.6.2.3</u>	<u>Pharmakodynamik</u>	19
<u>2.6.2.4</u>	<u>Neuroprotektion durch Sevofluran</u>	21
<u>2.6.3</u>	<u>Halothan</u>	22
<u>2.6.3.1</u>	<u>Physikalische und chemische Eigenschaften</u>	22
<u>2.6.3.2</u>	<u>Pharmakokinetik</u>	22
<u>2.6.3.3</u>	<u>Pharmakodynamik</u>	23
<u>2.6.3.4</u>	<u>Neuroprotektion durch Halothan</u>	23
<u>3</u>	<u>Eigene Untersuchungen</u>	24
<u>3.1</u>	<u>Zielsetzung</u>	24
<u>3.2</u>	<u>Material und Methoden</u>	24
<u>3.2.1</u>	<u>Versuchstierhaltung</u>	24
<u>3.2.2</u>	<u>Versuchsaufbau</u>	25
<u>3.2.3</u>	<u>Versuchstier-Gruppen</u>	25
<u>3.2.4</u>	<u>Versuchsvorbereitung von Abschnitt I</u>	26
<u>3.2.5</u>	<u>Narkose</u>	26
<u>3.2.6</u>	<u>Installation der Messsonden</u>	27
<u>3.2.7</u>	<u>Präparation der Gefäßzugänge</u>	27
<u>3.2.8</u>	<u>Narkoseumstellung</u>	28
<u>3.2.9</u>	<u>Äquilibrationsphase</u>	29
<u>3.2.10</u>	<u>Blutentzug</u>	29
<u>3.2.11</u>	<u>Ischämie</u>	29
<u>3.2.12</u>	<u>Reperfusion</u>	30
<u>3.2.13</u>	<u>Erholung</u>	30
<u>3.2.14</u>	<u>Versuchsende von Abschnitt I</u>	30
<u>3.2.15</u>	<u>Physiologische Parameter</u>	32
<u>3.2.16</u>	<u>5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU)-Applikation</u>	32
<u>3.2.17</u>	<u>Perfusion</u>	33
<u>3.2.18</u>	<u>Entnahme des Gehirns</u>	33
<u>3.2.19</u>	<u>Schneiden des Gehirns</u>	34
<u>3.2.20</u>	<u>Untersuchung des Gehirns</u>	35

3.2.21	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	35
3.2.21.1	Klassifizierung des Schadens	36
3.2.21.2	Auswertung	36
3.2.22	Flächenbestimmung des Gyrus dentatus	37
3.2.22.1	Auswertung	37
3.2.23	BrdU- Färbung	38
3.2.23.1	Lichtmikroskopie	40
3.2.23.2	Auswertung	40
3.2.24	Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit Fluoreszeinthiocyanat (FITC) und Neuronal nuclear protein (NeuN)	40
3.2.24.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	43
3.2.24.2	Auswertung	44
3.3	Laborbedarfsliste für die Färbungen	44
3.4	Statistische Datenauswertung	48
3.5	Ergebnisse	49
3.5.1	Physiologische Parameter während des operativen Teils des Versuchs	50
3.5.2	Histologische Untersuchung der Gehirne	57
3.5.2.1	HE-Färbung	57
3.5.2.2	Volumenbestimmung	62
3.5.2.3	Zellproliferation im Gyrus dentatus	63
3.5.2.4	Anteil der neu gebildeten Neuronen im Gyrus dentatus nach einer inkompletten zerebralen Ischämie	66
4	Diskussion	70
4.1	Diskussion der Methoden	71
4.1.1	Wahl der Tierart	71
4.1.2	Ischämiemodell	71
4.1.3	In-vivo-Markierung der Stammzellen und deren Nachkommen	72
4.1.4	Volumenbestimmung des Gyrus dentatus	74
4.1.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	74
4.1.6	BrdU-Färbung	75
4.1.7	Doppelfärbung	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse	78
4.2.1	Physiologische Parameter	78
4.2.2	Histologische Untersuchungen	81
4.3	Schlussbetrachtung	87
5	Zusammenfassung	88
6	Summary	90
7	Literaturverzeichnis	92
8	Tabellenverzeichnis	106
9	Abbildungsverzeichnis	107
10	Abkürzungsverzeichnis	108
11	Danksagung	112
12	Lebenslauf	113

1 EINLEITUNG

Ende der 90er Jahre fiel mit der Entdeckung adulter neuronaler Stammzellen in mehreren Gehirnregionen bei Erwachsenen das bis dahin gültige neurowissenschaftliche Dogma, dass Nervenzellen im Gehirn Erwachsener postnatal nicht mehr neu gebildet werden können. Obwohl es bereits in den 60er Jahren erste Berichte über adulte Neurogenese bei Säugetieren gab, wurden diese Untersuchungen angezweifelt und nicht weiter ernst genommen. Erst mit der Entwicklung besserer Untersuchungsverfahren im Laufe der Jahre, rückten adulte Stammzellen in das Zentrum des wissenschaftlichen und öffentlichen Interesses.

Obwohl sich die therapeutischen Erfolge in der Behandlung neuronaler Erkrankungen in den letzten Jahren erheblich verbessert haben, gibt es für viele chronische und akute ZNS-Erkrankungen keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Das Vorhandensein von neuronalen Stammzellen und die spontane Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn lassen Wissenschaftler hoffen, dass diese endogenen Stammzellen stimuliert werden können und so eine Regeneration des zentralen Nervensystems bei Schädigung durch neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer oder bei akuter Schädigung, zum Beispiel beim Schlaganfall, bewirken können. Der Einsatz adulter neuronaler Stammzellen könnte somit zu einer denkbaren Alternative zu embryonalen Stammzellen werden, deren Verwendung ethisch nicht unbedenklich ist.

Erkrankungen des zentralen Nervensystems spielen in den Morbiditäts- und Mortalitätsstatistiken der Weltgesundheitsorganisation eine bedeutende Rolle. So finden sie sich nach kardiovaskulären und onkologischen Erkrankungen an dritter Stelle. Rund 200.000 Menschen erleiden jährlich einen Schlaganfall, dessen Morbiditätsrate mit zunehmendem Alter rapide ansteigt. In der heutigen Zeit erkranken aber auch immer mehr junge Leute. Rund 20 % der Schlaganfallpatienten sterben innerhalb von vier Wochen, fast 40 % innerhalb eines Jahres. Insgesamt leiden in Deutschland rund eine Millionen Menschen unter den Folgen eines Schlaganfalls. Neben dem akuten Schlaganfall in der Notfallmedizin sind für den Anästhesisten auch während herz- und gefäßchirurgischer Operationen auftretende zerebrale Ischämien von Bedeutung, da diese immer mit einem Verlust an Nervenzellen verbunden sind. Die Häufigkeit neurologischer Schädigungssymptome nach herzchirurgischen Eingriffen wird mit 30 bis 80 % angegeben. Die Rückkehr solcher Patienten in den Alltag und ins Berufsleben ist oft gar nicht mehr oder nur mit starken Einschränkungen möglich. Ein Drittel der Patienten bleibt dauerhaft pflegebedürftig.

Es bestehen viele Untersuchungen zur Steigerung der endogenen Neurogenese nach zerebraler Ischämie im adulten Gehirn. In einem Vorversuch aus der eigenen Arbeitsgruppe

EINLEITUNG

konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate adulter Stammzellen im Hippokampus nach einer inkompletten zerebralen Ischämie ansteigt (ENGELHARD et al. in Vorbereitung). Der größte Teil dieser neu gebildeten Zellen differenziert sich zu Nervenzellen aus.

Über eine mögliche Beeinflussung adulter neuronaler Stammzellen nach zerebraler Ischämie durch Anästhetika ist jedoch bislang in der Literatur nichts beschrieben worden. So stellt sich die Frage, ob Anästhetika, bei denen eine neuroprotektive Wirkung nachgewiesen wurde, substanz- oder konzentrationsabhängig, einen Einfluss auf Proliferation und Ausdifferenzierung der neu gebildeten Zellen haben und auf diese Weise eine endogene Regeneration des neuronalen Schadens fördern können. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Wirkung der volatilen Anästhetika Sevofluran und Halothan auf die Neurogeneserate nach inkopleter zerebraler Ischämie im Hippokampus der adulten Ratte.

2 SCHRIFTTUM

2.1 **Das Gehirn (*Encephalon*)**

Das Gehirn der Säugetiere gliedert sich vereinfacht in drei Hauptabschnitte: In das Großhirn (*Cerebrum*), das Kleinhirn (*Cerebellum*) und den Hirnstamm (*Truncus encephali*), wobei sich am Hirnstamm wiederum das verlängerte Mark (*Medulla oblongata*) von der Brücke (*Pons*) und von dem Mittelhirn (*Mesencephalon*) unterscheiden lässt. Das Kleinhirnzelt (*Tentorium cerebelli*) unterteilt die knöcherne Begrenzung des Gehirns in eine große Schädelhöhle für das Großhirn und in eine kleinere Höhle für das Kleinhirn. Zwischen Knochen und Gehirn befinden sich die Hirnhäute, welche das Gehirn allseitig umgeben und es vor mechanischer Einwirkung schützen (KÖNIG und LIEBIG 1999).

Das Großhirn besteht aus den zwei Großhirnhemisphären, welche durch die *Fissura longitudinalis cerebri* äußerlich voneinander getrennt werden, innerlich aber noch durch den Balken miteinander in Verbindung stehen. An jeder Hemisphäre lassen sich äußerlich vier Hauptareale unterscheiden, die als *Lobi cerebri* bezeichnet werden, nämlich der *Lobus frontalis*, *Lobus parietalis*, *Lobus temporalis* und *Lobus occipitalis*. Beim Menschen beträgt das Großhirn allein 80 % der gesamten Hirnmasse (BENNINGHOFF und DRENCKHAHN 2002).

Die äußerste Schicht des Großhirns, auch als Kortex bezeichnet, besteht aus einer Rindenschicht (graue Substanz) und wird überwiegend aus Zellkörpern gebildet. Im Gegensatz dazu besteht die innere Markschiicht (weiße Substanz) aus einer Ansammlung von myelinisierten Nervenfasern (LIEBMANN 1993).

Das Nervengewebe besteht aus zwei Hauptkomponenten, den Nervenzellen (Neuronen) und den Gliazellen. Der Mensch besitzt in der Großhirnrinde ca. 16 Milliarden Nervenzellen, deren Ausläufer zusammengefasst eine Länge von 500.000 Kilometern ergeben würden (SILBERNAGEL und DESPOPOULOS 1991).

Da die Nervenzellen die am höchsten spezialisierten Zellen des Organismus sind, benötigt jede Nervenzelle eine Verbindung zu den lebenswichtigen Gliazellen, welche die Nervenzellen ernähren und räumlich stützen. Gliazellen erfüllen aber nicht nur Ernährungs-, Stoffwechsel- und Stützfunktionen, sondern sie bilden auch die Axonscheide der Nervenfasern, sowie die Blut-Hirn-Schranke und sie helfen bei Regenerationsvorgängen. Die Gliazellen des Gehirns unterteilt man morphologisch und funktionell in Ependymzellen,

Makroglia (Astrozyten), Oligodendrozyten und Mikroglia. Die Anzahl der Gliazellen übertrifft die der Nervenzellen um das Zehnfache (LIEBICH 2003).

In der Mitte des Gehirns liegt der Hippokampus, welcher in der Gehirnforschung eine zentrale Rolle spielt.

2.2 Der Hippokampus

Das Wort Hippokampus stammt aus dem Lateinischen und bedeutet übersetzt Seepferdchen. Ursprünglich zusammengesetzt ist es aus dem griechischen Wörtern für Pferd (*hippos*) und Raupe (*kampe*). Die Bezeichnung Hippokampus wurde erstmals im Jahre 1578 von dem italienischen Anatom Julius Caesar Arantius verwendet, der damit eine sichtbare weißliche Erhebung im Temporallappen beschrieb. Erst 200 Jahre später (1742) kam der Begriff Ammonshorn durch Garengeot dazu (WALTHER 2002).

Im Laufe der embryonalen Großhirnentwicklung rollt sich der ventromediale Hemisphärenwandrand im Bereich des Temporallappens ein und bildet so die Hippokampusformation (*Gyrus hippocampi*). Am Anfang der Entwicklung sind die Anlagen des Hippokampus und des Gyrus dentatus noch miteinander verbunden. Durch die halbmondförmige Aufwölbung des Hippokampus in den Ventrikel bildet sich der *Sulcus hippocampi* aus, der die zwei Strukturen voneinander trennt (RÜSSE und SINOWATZ 1991). Der Hippokampus, auch Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) genannt und der Gyrus dentatus bilden zwei gebogene ineinandergreifende U-förmige Blätter, wobei sich das Ende des Hippokampus (CA4-Region) zwischen die Wölbung des Gyrus dentatus schiebt (DUVERNOY 1988).

Abbildung (Abb.) 01 verdeutlicht die komplizierte Struktur.

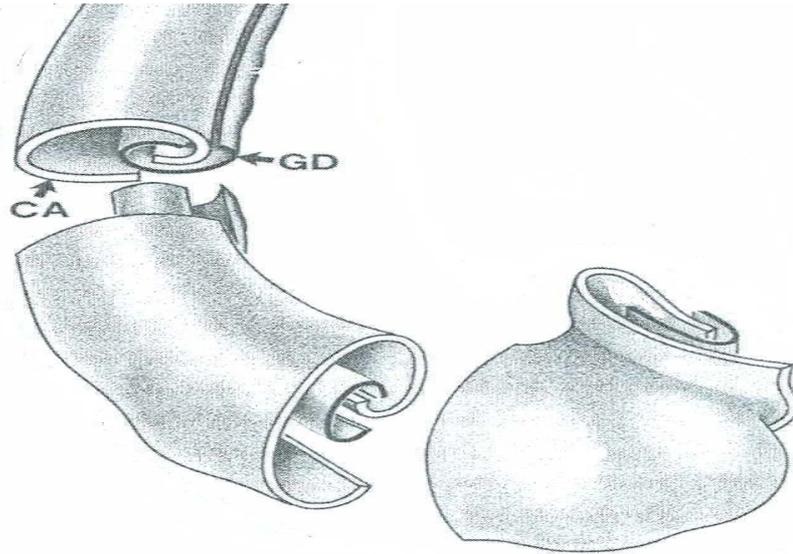


Abb. 01. Modifizierte schematische Darstellung des Hippokampus und des Gyrus dentatus nach DUVERNOY (1988).

Die Abbildung zeigt die räumliche Anordnung des Hippokampus (CA) zum Gyrus dentatus (GD).

Die Einteilung des Ammonhorns in vier verschiedene Subregionen (CA1-CA4) geht auf den Neuroanatom Lorente de No im Jahr 1934 zurück, sie beruht auf der unterschiedlichen Morphologie der sich dort befindlichen Nervenzellen. Im Gegensatz zur CA1-Region, die bei einer Unterbrechung der Blutversorgung rasch mit Zelluntergang reagiert, gilt die CA3-Region als eher widerstandsfähig (ITO et al. 1975; DUVERNOY 1988).

Der Gyrus dentatus zeigt einen 3-schichtigen Feinaufbau: die Molekularschicht (*Stratum moleculare*), die Körnerschicht (*Stratum granulosum*) und die polymorphzellige Schicht (*Stratum multiforme*). Die mittlere Körnerschicht ist zellreich und besteht aus sogenannten Körnerzellen (kleine Neuronen), während die zwei anderen Schichten vor allem aus Gliazellen und Dendriten bestehen (HEES und SINOWATZ 2000).

Neben dem Hippokampus und dem Gyrus dentatus zählen auch der *Gyrus parahippocampalis*, die *Fimbria hippocampi* und der *Fornix* zur Hippokampusformation.

Aus funktioneller Sicht stellt der Hippokampus eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems dar. Er spielt eine entscheidende Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen (NICKEL et al. 1991).

2.3 Stoffwechsel und Gefäßversorgung des Gehirns

Das Gewicht des menschlichen Gehirns beträgt nur 2 % des Körpergewichts (im Durchschnitt 1500 g), trotzdem erhält das Gehirn ca. 15 % des gesamten Herz-Minuten-Volumens (etwa 1,2 Liter) und verbraucht in etwa 20 % des gesamten Körpersauerstoffbedarfs. Mit 55 ml Blut pro min werden je 100 g des Gehirns mit Glukose versorgt, dieser relativ hohe Bedarf (5 bis 6 g Glukose/h) spiegelt die starke Leistung wieder, die das Gehirn erbringen muss. Um diesen Bedarf gewährleisten zu können, werden Schwankungen des mittleren zerebralen Perfusionsdrucks im Bereich von 50 bis 150 mmHg durch zerebrovaskuläre Autoregulation weitgehend ausgeglichen, sodass die Durchblutung des Gehirns insgesamt konstant bleibt (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991).

So kommt es erst zum Untergang von Nervenzellen, wenn der Blutfluss unter 12 bis 10 ml /min/100 g Hirngewebe abfällt. Ist die Autoregulation aus pathophysiologischen Gründen gestört (z.B. beim Schlaganfall) und wird das Gehirn nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt, schaltet der Stoffwechsel auf anaerobe Energiegewinnung um. Durch vermehrte Anhäufung von Laktat bildet sich eine Gewebsazidose aus, es kommt zu strukturellen Schäden und somit zum Ablauf einer Schadenskaskade, an deren Ende der Zelltod steht (KEMPSKI 1994). Siehe Kapitel 2.4.2.

Die Gefäßversorgung des Gehirns wird bei den meisten Säugetierarten und auch beim Menschen von vier Arterien (A.) übernommen. Ventral liegen die kräftigen Halsschlagadern (*Arteriae carotides*), welche rechts aus dem *Truncus brachiocephalicus*, links direkt aus der Aorta entspringen und sich in Höhe des Halses jeweils in eine innere Halsschlagader (*A. carotis interna*), welche das Gehirn mit Blut versorgt, und eine äußere Halsschlagader (*A. carotis externa*), welche unter anderem Gesichts- und Kaumuskulatur, Gesichtshaut wie auch den gesamten übrigen Kopf mit Blut versorgt, verzweigen. Jeweils aus den Armschlagadern (*Aa. subclaviae*) entspringen weiter kaudal ebenfalls die zwei Wirbelbogenarterien (*Aa. vertebrales*), welche durch spezielle Löcher in den seitlichen Fortsätzen der Wirbelbögen der Halswirbelsäule nach oben ziehen und sich in Höhe der Brücke zur *A. basilaris* vereinigen (TREPPEL 2004).

Circulus Willisii

Die *Aa. carotides internae* verzweigen sich am Ende jeweils in drei Äste, die vordere und die mittlere Gehirnarterie (*A. cerebri anterior und media*) sowie die hintere Verbindungsarterie (*A. communicans posterior*). Die vorderen Gehirnarterien beider Seiten sind nach kurzem parallelem Verlauf über die vordere Verbindungsarterie (*A. communicans anterior*)

miteinander verbunden. Die aus den beiden *Aa. vertebrales* entspringende *A. basilaris* teilt sich an ihrem Ende in die zwei hinteren Gehirnarterien (*Aa. cerebri posteriores*) auf, welche jeweils über die hintere Kollateralarterie (*A. communicans posterior*) mit dem Versorgungsgebiet der *A. carotis interna* in Verbindung stehen. Insgesamt entsteht also ein länglicher Ring aus den untereinander verbundenen Ästen der vier das Gehirn versorgenden Arterien, der sogenannte *Circulus Willisii*. Dieser ist nicht bei allen Menschen gleich. So ist der Ring nur bei ca. 90 % der Menschheit geschlossen und es können die verschiedensten Variationen auftreten (BENNINGHOFF und DRENCKHAHN 2002).

Auch bei der Ratte zeigt der *Circulus Willisii* (auch *Circulus arteriosus* genannt) individuelle Variationen, insgesamt ist die zerebrale Durchblutung aber durchaus mit der des Menschen vergleichbar (YAMORI et al. 1976).

Die blutabführenden Venen des Gehirns münden in ein System von Hohlräumen (*Sinus*), welche durch Faltungen der Gehirnhaut (*Dura mater*) entstehen. Über die Drosselrinnenvenen (*Venae jugulares*) sowie über kleinere Venenplexen gelangt das venöse Blut zurück zum Herzen (TREPPEL 2004).

2.4 Zerebrale Ischämie

2.4.1 Allgemeines

Als Ischämie des Gehirns bezeichnet man eine Reduktion des zerebralen Blutflusses. Man kennt vier Formen der zerebralen Ischämie: die komplette globale, die inkomplette globale, die komplette fokale und die inkomplette fokale Ischämie (WERNER 2000).

Beispiele für die verschiedenen Formen finden sich in der Abbildung 02.

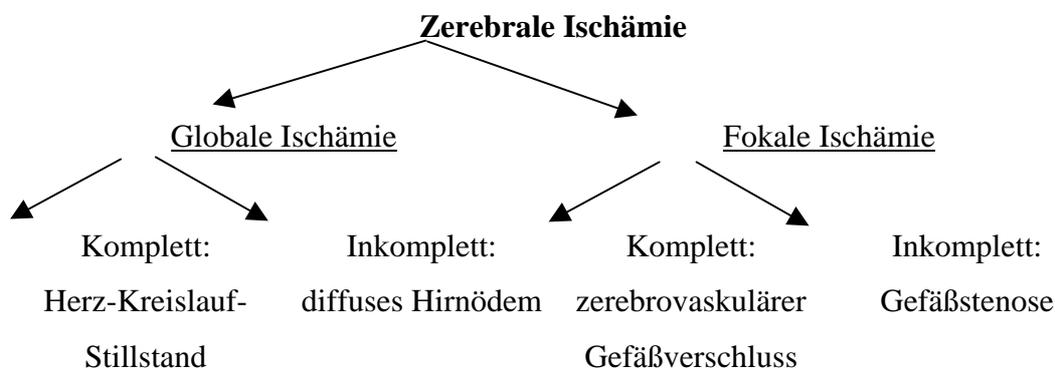


Abb. 02. Formen der zerebralen Ischämie mit Beispielen (modifiziert nach HENNES 1999).

Kommt es zu einer vollständigen Unterbrechung der Gehirndurchblutung z.B. beim Herz-Kreislauf-Stillstand, spricht man von einer kompletten globalen Ischämie, die inkomplette Form entsteht z.B. durch ein diffuses Hirnödem, bei dem zwar noch eine geringe Durchblutungsrate vorhanden ist, aber das gesamte Gehirn nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann. Betrifft die Minderperfusion nur spezifische Regionen des Gehirns, bezeichnet man sie als fokal. Ein Beispiel für die komplette fokale Ischämie ist ein vollständiger Gefäßverschluss eines Gehirngefäßes. Der nicht vollständige Verschluss resultiert in einer inkompletten fokalen Ischämie (HENNES 1999).

2.4.2 Pathophysiologie

Bei einer zerebralen Ischämie kommt es zu einer Minderversorgung der Nervenzellen mit Sauerstoff und Glukose. Während sich nach einer nur kurz andauernden Durchblutungsminderung des Gehirns die betroffenen Neuronen durchaus funktionell wieder erholen können, führt eine längere Unterbrechung zur irreversiblen strukturellen Schädigung der Nervenzellen. Durch den Sauerstoffmangel sinkt die Energiegewinnung über den Zitronensäurezyklus, Adenosin-Triphosphat (ATP) kann auf diesem Weg nicht mehr ausreichend hergestellt werden. Bereits 20 Sekunden nach Eintritt einer kompletten Ischämie ist das vorhandene ATP soweit verbraucht, dass die Synapsenaktivität der Zelle zum Stillstand kommt (HENNES 1999).

Durch Umschalten der Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse kommt es zu einer Laktatanhäufung im Gewebe und führt damit zur Azidose. Der pH-Wert fällt dabei auf Werte bis zu 5,6; es kommt zu Störungen der Zellmembranpermeabilität. Aufgrund des ATP-Mangels kommt es nach kurzer Zeit zum Anstieg der extrazellulären Kalium- (K^+) und der intrazellulären Natriumkonzentration (Na^+) und damit zum Zusammenbruch des membranstabilisierenden Ionengradienten. Dies wiederum führt zum Wassereinstrom in den Intrazellulärraum der Nervenzelle, die Zelle schwillt an, ein Ödem entsteht (SIESJÖ 1992).

Wird in diesem Zustand die Energieversorgung wieder hergestellt, kann sich die Zelle von selbst erholen (HENNES 1999).

Durch eine massive Ausschüttung von Glutamat bei gleichzeitiger verminderter präsynaptischer Aufnahme kommt es zu einer stark erhöhten Konzentration des exzitatorischen Transmitters. Dieser führt über eine verstärkte Stimulation der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren zur Öffnung von Kalziumkanälen und Kalzium wird intrazellulär angereichert. Dadurch werden wiederum die verschiedensten Enzymsysteme aktiviert. So werden zum Beispiel Phospholipasen, Proteasen, Endonukleasen und

Lipidoxidasen freigesetzt, welche die Lipidoxidation von Zellmembranen einleiten, und dadurch die Zellstruktur irreversibel zerstören (MATTSON und CHENG 1993).

Die Entstehung von freien Radikalen (Sauerstoff- und Stickstoffmonoxidradikale) führt nicht nur zu weiteren strukturellen Schäden sondern auch zu einer Aktivierung inflammatorischer Zellen wie Mikroglia und Leukozyten, die als Mediatoren des sekundären Gehirnschadens gelten (GRAHAM und LANTOS 1997).

Es finden sich sowohl Nekrose als auch Apoptose nach einer zerebralen Ischämie. Von nekrotischem Zelltod spricht man, wenn die Zellen durch äußere Noxen passiv nach 12 bis 24 Stunden zugrunde gehen. Im Gegensatz dazu spricht man vom apoptotischen Zelltod, wenn der Zelluntergang aktiv von der Zelle selbst ausgeht und erst nach Tagen eintritt (KERR et al. 1971; COHEN 1993).

In Folge einer zerebralen Ischämie kommt es zu einer gesteigerten Neurogenese durch adulte neuronale Stammzellen (siehe Kapitel 2.5.4).

2.4.3 Tiermodelle der globalen Ischämie

Für die verschiedenen zerebralen Ischämieformen wurden im Laufe der Jahre eine Vielzahl an experimentellen Tiermodellen entwickelt. Diese Modelle erfüllen unterschiedliche Anforderungen, sodass für die verschiedenen Versuche das optimale Tiermodell sorgfältig ausgesucht werden muss. Bedacht werden müssen, neben einer Übertragbarkeit auf den Menschen eine gute Reproduzierbarkeit, materieller Kostenaufwand, aber auch Tierschutz-Aspekte (GINSBERG und BUSTO 1989).

Eine generelle Übersicht über die wichtigsten fokalen und globalen Ischämie-Modelle findet sich bei GINSBERG und BUSTO (1989).

(Da in der vorliegenden Studie ein Modell der inkompletten temporären globalen Vorderhirnischämie (bilateraler Verschluss der *Aa. carotides* kombiniert mit 10-minütigem Blutentzug und anschließender Reperfusion bei der Ratte) verwendet wird, soll an dieser Stelle nur auf die bekanntesten Tiermodelle der globalen Ischämie näher eingegangen werden.)

Modelle der kompletten globalen zerebralen Ischämie

Das einfachste Modell einer kompletten globalen Ischämie stellt die rasche Abtrennung des Schädels vom Körper des Tieres dar (LOWRY et al. 1964). Dieses Verfahren wird hauptsächlich zu metabolischen Studien eingesetzt (ABE et al. 1983; YOSHIDA et al. 1985).

Ein weiteres Modell ist das Herbeiführen eines Herz-Kreislauf-Stillstandes durch intrakardiale Kaliuminfusion (NAKASHIMA et al. 1995). Ein Kreislauf-Stillstand kann auch durch

künstlich erzeugtes Kammerflimmern induziert werden, wobei man anschließend reanimiert (DEAN et al. 1987; BERKOWITZ et al. 1991).

Ein aufwendigeres Modell stellt der künstliche Verschluss der wichtigsten zuführenden Blutgefäße dar. SHIRANE et al. beschreiben 1991 den permanenten Verschluss der *A. basilaris* durch Elektrokoagulation. Der Verschluss der *Aa. pterygopalatinae* und der *Aa. carotides externae* erfolgt durch Katheterisierung. Durch zusätzlichen Verschluss der *Aa. carotides communes* mit Gefäßklammern wird eine vollständige Unterbrechung der Gehirndurchblutung bei der Ratte erreicht.

Modelle der inkompletten globalen zerebralen Ischämie

1978 beschrieben SIEMKOWICZ und HANSEN eine Methode, bei der den Tieren eine eng sitzende, aufblasbare Halsmanschette umgelegt wird ("Neck-Tourniquet-Methode"). Durch Aufblasen der Manschette erreicht man eine mechanische Komprimierung der Halsgefäße (Strangulationsischämie) und somit eine Unterbrechung des zerebralen Blutflusses. Allerdings erreicht man mit diesem Modell keine komplette Unterbrechung der Blutzufuhr.

Eine Verbesserung erfuhr dieses Modell durch NEMOTO et al. (1977), indem erst nach Reduzierung des Blutdrucks auf 50 mmHg die Kompression durch die Halsmanschette erfolgt.

LJUNGGREN et al. induzieren 1974 durch Anheben des intrakraniellen Zerebrospinaldruckes eine Kompressionsischämie bei der Ratte. Dies gelingt ihnen durch infundieren von künstlich erzeugtem Liquor direkt ins Gehirn.

Ein altes, derzeit aber immer noch weit verbreitetes Modell ist die sogenannte two-vessel occlusion (2-VO). EKLÖF und SIESJÖ arbeiten damit schon 1972. Hier wird bei der Ratte ein temporäres bilaterales Abbinden der rechten und linken *A. carotides communis* kombiniert mit einer systemischen Senkung des Blutdrucks durchgeführt. Die Absenkung des Blutdrucks kann entweder durch alleinigen Blutentzug erfolgen (EKLÖF und SIESJÖ 1972) oder medikamentös (SMITH et al. 1984).

PULSINELLI und BRIERLEY (1979) erweitern das 2-VO Modell bei der Ratte durch die sogenannte four-vessel occlusion (4-VO). Hier erfolgt am ersten Tag des Versuchsvorhabens eine Operation, bei der ein permanenter Verschluss der *Aa. vertebrales* auf Höhe des ersten Halswirbels durch Elektrokoagulation erreicht wird. In derselben Operation werden des Weiteren locker sitzende Schlingen um die *Aa. carotides communes* angebracht, welche am zweiten Tag beim wachen Tier temporär verschlossen werden können.

2.5 Stammzellen

Mit Hilfe der oben genannten Tiermodelle werden grundlegende pathophysiologische Mechanismen des Nervenzellunterganges nach einer globalen zerebralen Ischämie und deren verschiedensten Therapieansätze untersucht. Besondere Hoffnungen liegen hier unter anderem im Ersatz von zugrunde gegangenen Neuronen durch Aktivierung von endogenen Stammzellen (PETERSON 2002).

Bei Stammzellen handelt es sich um noch nicht ausdifferenzierte Zellen, d.h. Zellen, die noch nicht über gewebespezifische Merkmale verfügen. Stammzellen besitzen die Potenz, sich nahezu unbegrenzt zu teilen und sich in verschiedene Gewebezellen zu entwickeln.

Stammzellen können nach ihrem Potential in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen eingeteilt werden. Totipotent sind die befruchtete Eizelle und die ersten aus der Zellteilung der befruchteten Eizelle hervorgegangenen Zellen bis zum 8-Zellstadium.

Das Differenzierungspotential nimmt im Laufe der Entwicklung des Embryos ab. Nach dem 8-Zellstadium sind die Zellen zwar noch in der Lage, sich in mehr als 200 verschiedene Gewebearten des Körpers zu differenzieren, sie sind jedoch nicht in der Lage, sich zu einem vollständigen Organismus zu entwickeln. Man bezeichnet diese Zellen als pluripotent. Multipotent sind alle gewebespezifischen Stammzellen, aus denen nur noch Zellen des betreffenden Gewebes hervorgehen können (ALISON et al. 2002).

2.5.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen befinden sich im Inneren des Embryoblasten und können dort zwischen Tag 4 und 5 der Embryonalentwicklung gewonnen werden. Die Gewinnung humaner Stammzellen gelang erstmals THOMSON et al. (1998).

Sie zeichnen sich durch eine gute In-vitro-Kultivierbarkeit aus, da sie problemlos auch über längere Zeit ihre Fähigkeit zur Zellteilung beibehalten. Zu den embryonalen Stammzellen gehören auch die embryonalen Keimzellen, welche sich in den fetalen Keimanlagen befinden. Außerdem gehören in diese Gruppe auch die Nabelschnurstammzellen (PRELLE 2001).

Der Einsatz embryonaler Stammzellen ist ethisch nicht unproblematisch, da sie nur aus Embryonen gewonnen werden können. In Deutschland ist nach dem Embryonenschutzgesetz die Gewinnung von humanen embryonalen Stammzellen nicht zugelassen (EMBRYONENSCHUTZGESETZ 1990).

2.5.2 Adulte Stammzellen

Stammzellen kommen auch im erwachsenen Organismus vor. Sie besitzen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nur eine begrenzte Teilungsfähigkeit und dienen in einem gewissen Umfang zur Regeneration von zugrunde gegangenen ausdifferenzierten Gewebezellen. Ein Nachweis über das Vorhandensein dieser Zellen gelang bisher für das hämatopoetische System, den Gastrointestinaltrakt, die Haut, die Muskulatur, das Gehirn und die Retina (ALISON et al. 2002).

2.5.3 Adulte neuronale Stammzellen

Nervenzellverluste im Gehirn galten bislang als irreversibel. Dieses Dogma wurde im letzten Jahrzehnt aufgegeben, da eine Neubildung von Nervenzellen auch über die Embryogenese hinaus möglich ist. Erste Berichte über dieses Phänomen finden sich im Jahre 1912. ALLEN (1912) berichtet damals als erster über Zellteilungsvorgänge im lateralen Ventrikel adulter Albinoratten. Ein weiterer Pionier der neuronalen Stammzellforschung ist ALTMANN (1962). Seine Arbeitsgruppe führte autoradiographische Untersuchungen unter Verwendung von [^3H]-Thymidin an Rattengehirnen durch (ALTMAN 1962; ALTMAN und DAS 1965). Allerdings wurden den daraus gewonnenen Beobachtungen zur postnatalen Neurogenese beim Säugetier keinerlei Beachtung geschenkt. Erst Jahre später nahm man Untersuchungen in dieser Richtung wieder auf. KAPLAN und HINDS (1977) lieferten mit Hilfe des Elektronenmikroskops den Beweis, dass die neu gebildeten Zellen im Gehirn neuronale Merkmale besitzen. Weitere Fortschritte in der Forschung wurden durch die Entwicklung immunhistochemischer Nachweisverfahren ermöglicht. GRATZNER (1982) entwickelte eine Alternativmethode zur bisher verwendeten radioaktiven Markierung proliferierender Zellen. Dabei arbeitet man mit dem synthetisch hergestellten 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU). BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNS aller sich in der Synthese-Phase (S-Phase) der Mitose befindlichen Zellen kompetitiv eingebaut und kann dann mit monoklonalen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Abbildung 03 stellt den Einbau von BrdU schematisch dar.

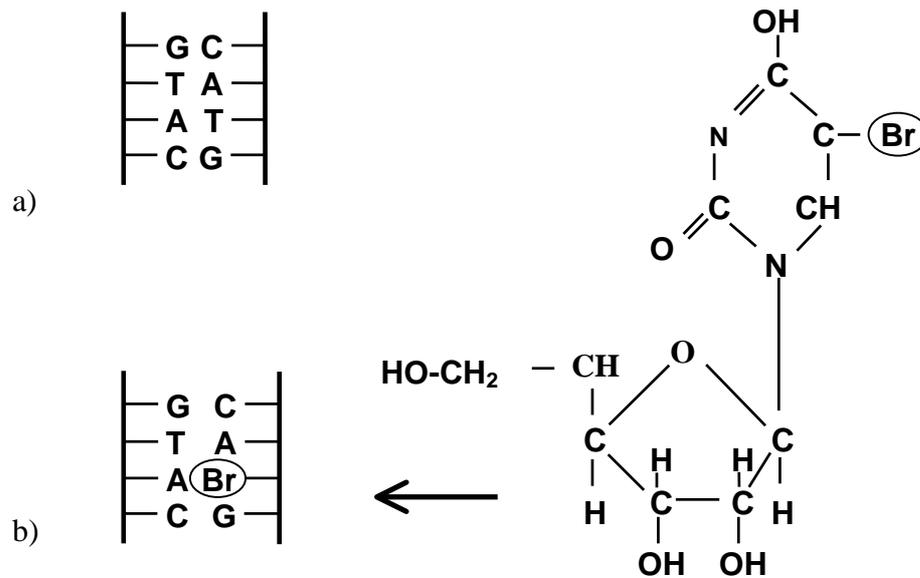


Abb. 03. Schematische Abbildung der Markierung mitotischer Zellen mit 5-Bromo-2-deoxyuridin (modifiziert nach GRATZNER 1982).

Abb. a) zeigt den natürlichen Zustand der DNS nach der S-Phase des Zellzyklus, in der sich die DNS-Bausteine Thymidin und Adenin miteinander verbinden.

Abb. b) zeigt den Einbau von BrdU (chemische Strukturformel) an Stelle von Thymidin, welches mit Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus um den Einbau in die DNS konkurriert.

(G = Guanin; C = Cytosin; T = Thymidin; A = Adenin; Br = Brom)

Eine modernere Nachweismethode stellt die sogenannte Retrovirusmarkierung dar. Die Aufnahme des Retrovirus erfolgt während der Zellteilung, dabei kommt es zum stabilen Einbau von Virus-DNS in das Genom der Zelle. Alle retroviral infizierten Zellen geben das Virusgenom an ihre Tochterzellen weiter (PRICE et al. 1994).

Adulte Neurogenese wurde in der Zwischenzeit sowohl für Fische und Vögel (GOLDMAN und NOTTEBOHM 1983; ZUPANC und HORSCHKE 1995) als auch für Säugetiere (GOULD und TANAPAT 1997; GOULD et al. 1999a) nachgewiesen.

ERIKSSON et al. konnten 1998 als erste das Auftreten adulter Neurogenese im menschlichen Hippokampus nachweisen.

Die Hauptsynthese neuronaler Stammzellen findet in zwei Regionen des adulten Gehirns statt. Eine Region ist die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel. Diese Region stellt ein Rudiment des embryonalen Neuralrohres dar, aus dem während der Embryonalentwicklung sämtliche Zellen des Gehirns abstammen. Von hier aus wandern die Nachkommen der sich zeitlebens teilenden Stammzellen, sogenannte neuronale "Vorläuferzellen", entlang des rostralen Ausläufers der Ventrikelwand zum *Bulbus olfactorius*, wo sie sich dann in Neuronen

ausdifferenzieren. Im *Bulbus olfactorius* der adulten Ratte werden pro Tag mehrere tausend neue Nervenzellen gebildet (KUHNS et al. 1996).

Eine zweite Region, in der adulte Neurogenese stattfindet, befindet sich im Hippokampus, und zwar in der subgranulären Region des Gyrus dentatus zwischen dem Hilus und der Körnerzellschicht. Hier teilen sich Zellen fortlaufend und deren Nachkommen wandern in einem Zeitraum von etwa vier Wochen in die Körnerzellschicht ein, um sich dort zu Neuronen ausdifferenzieren (CAMERON et al. 1993).

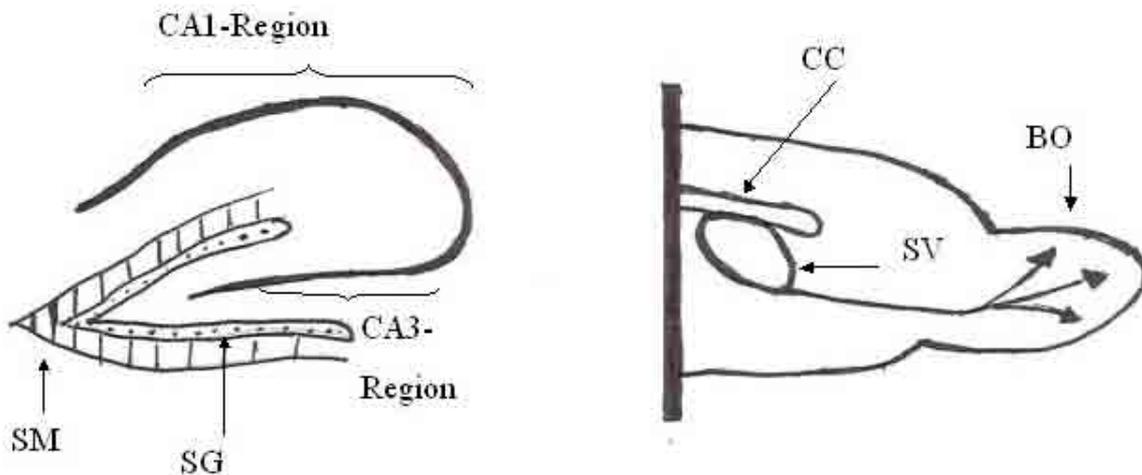


Abb. 04. Die zwei Hauptregionen adulter Neurogenese (modifiziert nach BIEBL et al. 2000).

Die linke Abb. zeigt den histologischen Feinbau des Hippokampus (CA1- und CA3-Region) und des Gyrus dentatus.

(CA = Cornu ammonis; SG = Stratum granulosum; SM = Stratum moleculare)

Die rechte Abb. zeigt die subventrikuläre Zone des Seitenventrikels in einem sagittalen Hirnschnitt der Ratte.

(CC = Corpus callosum; SV = Subventrikel; BO = Bulbus olfactorius)

Die Pfeile zeigen die Wanderrichtung der Vorläuferzellen.

Aus den neuronalen Vorläuferzellen können sich sowohl Neuronen als auch Astrozyten und Oligodendrozyten entwickeln. Deren histologische Unterscheidung gelingt mit Hilfe von zellspezifischen Markern wie zum Beispiel Neuronal nuclear protein (NeuN) für Neuronen oder Glial fibrillary acidic protein (GFAP) für Astrozyten (KUHNS et al. 1996).

Das Regenerationsvermögen des Gehirns ist enorm, so produziert allein der Gyrus dentatus der Ratte jeden Tag mehrere tausend Vorläuferzellen (CAMERON und MCKAY 2001).

STANFIELD und TRICE konnten 1988 nachweisen, dass die neugebildeten Nervenzellen auch in der Lage sind, Nervenfortsätze (Axone) auszubilden, welche in die CA3-Region einwachsen und sich dort funktionell integrieren können.

Dem ständigen Wachstum des Gehirns steht aber eine natürliche Begrenzung in Form der starren knöchernen Schädelkapsel gegenüber. Es stellt sich also die Frage, was mit den neu gebildeten Zellen passiert. BIEBL et al. untersuchten 2000 das Vorkommen und den Einfluss von Apoptose auf die physiologische Neurogeneserate. So konnte gezeigt werden, dass im Gyrus dentatus und in der subventrikulären Zone hundertmal mehr apoptotische Zellen vorkommen, als in anderen Gehirnregionen. Der täglichen Zellproliferation steht also ein Eliminierungsprozess in Form der Apoptose gegenüber. Dieses Phänomen ist nicht weiter verwunderlich, da Apoptose schon während der embryonalen Gehirnentwicklung zur Vernichtung überflüssiger Zellen dient (OPPENHEIM 1991).

In einer Studie von WINNER et al. (2002) nahm die Anzahl der neu gebildeten Zellen vier bis zwölf Wochen nach deren Proliferation wieder ab, danach nicht mehr. Es wird vermutet, dass in dieser Zeit der Großteil der aberrant entwickelten Nervenzellen abstirbt, hingegen funktionstüchtige Zellen weiter überleben. Neuere Untersuchungen ergaben, dass Neurogenese auch in anderen Regionen des erwachsenen Gehirns stattfindet. Dies wurde sowohl für den Kortex von Nagern (GU et al. 2000; MAGAVI et al. 2000; JIANG et al. 2001) als auch im Kortex von Primaten (GOULD et al. 1999a; BERNIER et al. 2002) nachgewiesen. Aber auch im Septum, im Striatum und im Balken finden sich neuronale Stamm- und Vorläuferzellen (PALMER et al. 1995).

Neurogenese kann bis ins hohe Alter nachgewiesen werden, allerdings kommt es mit zunehmendem Alter zu einer reduzierten Proliferationsrate (KUHN et al. 1996; ERIKSSON et al. 1998).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Stimulation der Sinneseindrücke durch ein sogenanntes "enriched environment" die natürliche Neurogeneserate steigern kann. Auch das alleinige Anbieten eines Laufrades im Mäusekäfig verdoppelt die Produktionsrate neuer Nervenzellen im Hippokampus (KEMPERMANN et al. 1997a; VAN PRAAG et al. 1999).

KEMPERMANN et al. (1997b) untersuchten den genetischen Einfluss auf die adulte hippocampale Neurogenese in vier verschiedenen Mäusestämmen. Sie fanden heraus, dass es für die Neurogeneserate eine genetische Prädisposition gibt.

Die Wachstumsfaktoren Epidermal growth factor (EGF) und Fibroblast growth factor (FGF-2) besitzen eine fördernde Wirkung auf die Vorläuferzellen im Rattengehirn. Die intraventrikuläre Infusion von EGF führte zur gesteigerten Proliferation in der subventrikulären Zone des Seitenventrikels, wobei die Differenzierungsrate in Gliazellen höher lag als die neuronale Differenzierungsrate. Interessanterweise kommt es bei der

Infusion von FGF-2 zum umgekehrten Effekt, hier überwiegt die neuronale Differenzierungsrate (KUHN et al. 1997).

GOULD et al. (1999b) können eine gesteigerte Neurogenese im Zusammenhang mit Hippokampus-abhängigem Lernen zeigen.

CAMERON et al. untersuchen 1995 den Einfluss des Neurotransmitters Glutamat auf die Produktion neuer Nervenzellen. Ein Mangel dieses Botenstoffes führt zu einer verstärkten Neurogenese im Gyrus dentatus. Auch Hormone können die Proliferationsrate beeinflussen.

GOULD (1994) stellt eine gesteigerte Proliferationsrate durch Östrogene fest. Einen hemmenden Einfluss auf die Neurogenese haben Glukokortikoide (GOULD et al. 1992). Auch sozialer und psychischer Stress führen zu einer Reduktion der Neurogenese (GOULD et al. 1998; TANAPAT et al. 1998).

Neben diesen physiologischen Einflussfaktoren auf die Neurogeneserate führen auch verschiedenste pathologische Läsionen des Gehirns zu einer Stimulierung der adulten Neurogenese. PARENT et al. zeigen 1997, dass epileptische Anfälle mit einer gesteigerten Neurogeneserate einhergehen.

GOULD und TANAPAT beobachten 1997 nach künstlich erzeugten Hirnläsionen eine deutliche Zunahme neuronaler Proliferation im Gyrus dentatus adulter Ratten.

Die Erforschung neuronaler Stammzellen im adulten Organismus gibt Hoffnung auf einen möglichen Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. bei Parkinson, bei Alzheimer und beim Schlaganfall.

2.5.4 Neurogenese nach zerebraler Ischämie

Mehrere Autoren haben gezeigt, dass es nach einer zerebralen Ischämie zu einer gesteigerten Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus kommt. Dies konnte zuerst beim Gerbil gezeigt werden (LIU et al. 1998). Es folgt 1999 der Nachweis bei der Maus (TAKAGI et al. 1999) gefolgt von der Ratte (JIN et al. 2001; KEE et al. 2001; YAGITA et al. 2001; TAKASAWA et al. 2002).

In der Literatur finden sich bei Anwendung von zerebralen Ischämiemodellen zur Untersuchung der adulten Neurogenese die unterschiedlichsten Narkosepräparate, die bei den Versuchen angewendet werden. GOULD und TANAPAT (1997) sowie KEE et al. (2001) verwenden Pentobarbital. Isofluran wird von LIU et al. (1998) verwendet. Ein Einsatz von Halothan in unterschiedlichen Dosierungen mit und ohne Lachgas (N₂O) findet sich bei JIN et al. (2001), YAGITA et al. (2001) und TAKASAWA et al. (2002).

Es stellt sich die Frage, ob die verwendeten Anästhetika nicht eventuell auch eine Auswirkung auf die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Stammzellen haben. (Mit der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Inhalationsanästhetika Sevofluran und Halothan generell bzw. in unterschiedlichen Dosierungen einen Einfluss auf die adulte Neurogeneserate im Gyrus dentatus der Ratte nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie ausüben.)

2.6 Inhalationsanästhetika Sevofluran und Halothan

Tab. 01. Physiko-chemische Daten von Sevofluran und Halothan (modifiziert nach CONZEN und HOBBAHN 2003)

Physiko-chemische Eigenschaften	Sevofluran	Halothan
Geruch	angenehm	angenehm
Atemwegsirritation	nein	nein
Brennbar	nein	nein
Explosiv	nein	nein
Metabolisierungsrate	< 5 %	17-20 %
Metabolite	Fluor, Hexafluorisopropanol	Fluor, Brom, Chlor, Trifluorazetat
UV- Licht Stabilität	ja	nein
Reaktion mit Metallen	nein	ja
Minimale alveoläre Konzentration (MAC ₅₀)	Mensch: 1,7 % Ratte: 2,4-2,8 %	Mensch: 0,8 % Ratte: 1-2 %
Siedepunkt	58,6 °C	50,2 °C
Spezifisches Gewicht	1,53 g/ml	1,86 g/ml
Konventioneller Verdampfer	ja	ja
Stabilität in feuchtem Atemkalk	nein	nein
Blut/Gas-Verteilungskoeffizient	0,69	2,35
Gehirn/Blut-Verteilungskoeffizient	1,7	1,9
Dampfdruck bei 20 °C	157 mmHg	244,1 mmHg
Zusätze	keine	Thymol
Molekulargewicht	200,06 Dalton	197,4 Dalton

Physiko-chemische Daten der beiden verwendeten Anästhetika im Vergleich.

2.6.1 Einführung

Unter einem Inhalationsanästhetikum versteht man ein über die Atemwege applizierbares, lipidlösliches Pharmakon, das im zentralen Nervensystem reversibel das Bewusstsein ausschaltet. Ein ideales Anästhetikum zeichnet sich durch eine geringe Nebenwirkungsrate bei gleichzeitig guter Steuerbarkeit und großer anästhetischer Potenz aus. Inhalationsanästhetika bieten in dieser Hinsicht viele Vorteile gegenüber Injektionsnarkotika. Sevofluran und Halothan gehören zur der Gruppe der sogenannten volatilen (flüchtigen) Inhalationsanästhetika (KOCHS et al. 2001).

Im Folgenden werden diese beiden Inhalationsanästhetika genauer beschrieben, eine vergleichende Übersicht findet sich in Tabelle (Tab.) 01 auf der Seite 17.

2.6.2 Sevofluran

2.6.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Sevofluran ist ein Methylpropyläther mit sieben Fluoratomen (chemische Bezeichnung: Fluormethyl-2,2,2-trifluor-1-(trifluormethyl)äthyl-äther) (FREY und LÖSCHER 1996).

Strukturformel: $C_4H_7OF_7$

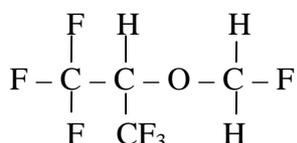


Abb. 05. Chemische Strukturformel von Sevofluran.

Sevofluran wurde zwar schon Ende der 60er Jahre synthetisiert, dennoch wurde es erst zu Beginn der neunziger Jahre in Japan erstmals klinisch eingeführt. Verantwortlich dafür sind die damals vermuteten Nachteile der Freisetzung von möglicherweise toxischen anorganischen Fluoridionen und die Bildung von eventuell nierenschädlichen Abbauprodukten in Kohlendioxid (CO₂)-Absorbern der Narkosegeräte. Allerdings sind bis heute keine toxischen Nebenwirkungen des Sevoflurans bekannt. Im Jahr 1995 erfolgte dann schließlich auch die Zulassung in Deutschland unter dem Handelsnamen Sevorange (Sevofluran, Abbott GmbH, Wiesbaden) (CONZEN und HOBBAHN 2003).

Sevofluran ist eine nicht brennbare, nicht explosive farblose Flüssigkeit mit angenehm mildem, nicht stechendem, Äther-ähnlichem Geruch. Sevofluran löst nach Inhalation keinen Hustenreiz aus, sodass es hervorragend für die Maskeneinleitung sowohl bei Erwachsenen als

auch vor allem bei Kindern geeignet ist. Das Molekulargewicht beträgt 200,06 Dalton, bei 20 °C liegt der Dampfdruck bei 157 mmHg (LARSEN 2001).

Das spezifische Gewicht beträgt 1,53 g/ml, während der Siedepunkt bei 58,6 °C liegt. Damit lässt sich Sevofluran ohne Weiteres über die konventionellen Verdampfer mühelos in einen gasförmigen Zustand überführen. Aufgrund der hohen molekularen Stabilität kommt es ohne jegliche Konservierungsstoffe bzw. Zusätze aus. Die Haltbarkeit beträgt mindestens 24 Monate (CONZEN und HOBBAHN 2003).

2.6.2.2 Pharmakokinetik

Sevofluran weist mit 0,69 einem im Vergleich zu Halothan (2,35) sehr niedrigen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten auf. Ursächlich hierfür ist die Halogenierung mit Fluor bzw. das fehlende Chloratom. Dies ermöglicht eine schnellere An- und Abflutungsgeschwindigkeit des Anästhetikums und damit eine leichtere Steuerbarkeit der Narkosetiefe sowie eine entsprechend schnellere Narkose Ein- und Ausleitung (YASUDA et al. 1991).

LERMAN et al. konnten 1984 zeigen, dass sich der Blut/Gas-Verteilungskoeffizient des Inhalationsanästhetikums auch mit zunehmendem Alter des Patienten nicht verändert.

Sevofluran ist das einzige fluoridierte Inhalationsanästhetikum, das nicht zu Trifluoressigsäure verstoffwechselt wird, es besteht damit keine Lebertoxizität. Die Metabolisierungsrate durch Zytochrom P₄₅₀ in der Leber beträgt zwischen 3 bis 5 %, dabei entstehen die Degradationsprodukte Hexafluorisopropanol, anorganisches Fluorid und CO₂. Während Hexafluorisopropanol sofort glukuronidiert wird und problemlos renal eliminiert wird, sagt man freigesetzten Fluoridionen eine potentielle nephrotoxische Wirkung nach.

Allerdings können MALAN et al. (1993) keine Beeinflussung der Nierenfunktion bei adulten Ratten unter Sevoflurannarkose feststellen. Auch konnte keine Nephrotoxizität beim Menschen nachgewiesen werden (BROWN 1995).

2.6.2.3 Pharmakodynamik

Der Grad der narkotischen Wirkung eines Inhalationsanästhetikums wird als MAC-Wert angegeben. MAC ist die Abkürzung für minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsnarkotikums in der Einatemluft bei der 50 % (MAC₅₀) aller Patienten auf einen Hautschnitt mit einer Abwehrbewegung reagieren bzw. bei welcher bei der Hälfte der Patienten eine ausreichende Narkosetiefe hervorgerufen wird. Je niedriger der MAC-Wert ist, desto höher ist die anästhetische Potenz des volatilen Anästhetikum (KOCHS et al. 2001).

Der MAC₅₀-Wert für Menschen mittleren Alters beträgt für Sevofluran 1,7 Vol%. Dieser im Vergleich zu Halothan (0,8 Vol%) deutlich höhere Wert beruht auf der Halogenierung mit

Fluor und der damit verbundenen geringeren Lipophilie (KATOH und IKEDA 1987). STEFFEY et al. (1996) geben für die Ratte einen MAC-Wert von 2,4 bis 2,8 Vol% an. Sevofluran führt weder bei einer Konzentration von 1,0 MAC als auch bei 2,0 MAC zu einer Atemwegsirritation (DOI und IKEDA 1993).

Wie bei allen anderen Inhalationsanästhetika kommt es zu einer dosisabhängigen Atemdepression, wobei ein verkleinertes Atemzugvolumen einer gesteigerten Atemfrequenz gegenübersteht (CONZEN und HOBBAHN 2003).

Eine Sevoflurannarkose greift nicht massiv in das Herz-Kreislauf-System ein. So wird die Herzfrequenz kaum beeinträchtigt und es treten auch keine Herzrhythmusstörungen auf, da Sevofluran keine Sensibilisierung für Katecholamine bewirkt. Allerdings kommt es zu einer Vasodilatation im gesamten Kreislauf und zu einer negativ-inotropen Wirkung auf die Herzmuskulatur (CONZEN und HOBBAHN 2003).

Sevofluran wirkt auf das zentrale Nervensystem dämpfend, es kommt zu einer dosisabhängigen Verminderung der elektroenzephalographischen Aktivität. In der Neuroanästhesie ist es besonders wichtig, dass die zerebrale Hämodynamik kaum beeinflusst wird. Fluorierte Gase sind deshalb besonders geeignet, da sie den zerebralen Sauerstoffverbrauch reduzieren, dabei aber Blutfluss und intrakraniellen Druck nur geringfügig beeinflussen (CONZEN und HOBBAHN 2003).

So zeigen KITAGUCHI et al. (1993), dass die Anästhesie mit 0,8 MAC Sevofluran bei Patienten mit ischämischer zerebrovaskulärer Erkrankung weder die zerebrale Autoregulation noch die CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefäßmuskulatur beeinträchtigt.

Während SCHELLER et al. (1988) beim Kaninchen eine Zunahme des intrakraniellen Drucks verzeichneten, können TAKAHASHI et al. (1993) beim Hund keine Zunahme feststellen.

Im Gegensatz zu Halothan trägt Sevofluran nicht wesentlich zum Abbau der atmosphärischen Ozonschicht bei (WESTHORPE und BLUTSTEIN 1990).

Sevofluran ist im basischen Milieu instabil. So entstehen in CO₂-Absorbern durch direkten Kontakt der Substanz mit Natronkalk oder Bariumkalk (starke Basen) in geringen Konzentrationen das Abbauprodukt Compound A (Pentafluormethoxyisopropylfluormethyläther) und Spuren von Compound B (Pentafluormethoxyisopropylfluormethyläther). Für Compound A besteht ein potentielles Nephrotoxizitätsrisiko (BROWN 1995).

Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen gibt es keine Hinweise auf Nephrotoxizität im klinischen Gebrauch beim Menschen, auch nicht bei Patienten mit Niereninsuffizienz (CONZEN und HOBBAHN 2003).

2.6.2.4 Neuroprotektion durch Sevofluran

WARNER et al. (1993) ermittelten bei der Ratte nach zerebraler Ischämie unter Sevoflurannarkose ein besseres neurologisches Endergebnis bei einem geringeren Ausmaß des neuronalen Zellschadens.

Eine wesentliche Komponente der neuroprotektiven Eigenschaften von Sevofluran bei zerebraler Ischämie stellt die ausgeprägte Reduktion des zerebralen O₂-Verbrauchs dar. Die damit verbundene Absenkung der Stoffwechselrate bewirkt eine Erhöhung der Ischämietoleranz des Gehirns nach inkompletter zerebraler Ischämie (WERNER et al. 1995).

Ein anderer neuroprotektiver Ansatz des Sevofluran findet sich bei HIROTA und ROTH (1997). In dieser Studie wurde der Einfluss von Sevofluran auf inhibitorische Gamma-Aminobuttersäure-(GABA)-Rezeptoren untersucht. So stabilisiert Sevofluran das Membranpotential von Nervenzellen über eine Stimulation der Rezeptoren. Die Zellen werden hyperpolarisiert und damit widerstandsfähiger gegen exzitatorische Impulse. Inhalationsanästhetika haben auch einen Einfluss auf exzitatorische Neurotransmitter. So reduziert Sevofluran dosisabhängig die Glutamatfreisetzung im Gehirn (VINJE et al. 2002).

TONER et al. (2001) und ENGELHARD et al. (2003) konnten eine verringerte Glutamat-Freisetzung nach zerebraler Ischämie unter Sevoflurannarkose zeigen. Über eine gleichzeitige verminderte Stimulation der NMDA-Rezeptoren fällt der Zellschaden geringer aus.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von Sevofluran auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen geworfen. In einer Studie von ENGELHARD et al. (2001) zeigte sich, dass sich vier Stunden nach einer zerebralen Ischämie in der Sevofluran-Gruppe eine deutlich geringere Rate an Apoptose-fördernden Proteinen findet, als in der Kontroll-Gruppe. In einer weiteren Studie wurde im selben Ischämiemodell der Beobachtungszeitraum auf 28 Tage ausgedehnt. Diesmal konnte in der Sevofluran-Gruppe eine erhöhte Rate an Apoptose-hemmenden Proteinen gefunden werden, gleichzeitig war die Rate Apoptose-fördernder Proteine gegenüber der Kontroll-Gruppe erniedrigt (ENGELHARD et al. 2004). In beiden Untersuchungen wurde zusätzlich der neuronale Schaden bestimmt und für die Sevofluran-Gruppe niedrigere Werte ermittelt. Sevofluran kann also das Vorkommen von Apoptose und Nekrose nach zerebraler Ischämie reduzieren und so den ischämischen Zellschaden verringern. In der Literatur finden sich bisher keine Angaben zu Untersuchungen eines Einflusses von Sevofluran auf adulte neuronale Stammzellen.

2.6.3 Halothan

2.6.3.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Halothan ist ein halogener Kohlenwasserstoff mit drei Fluoratomen, einem Chloratom und einem Bromatom (chemische Bezeichnung: 2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluoräthan) (FREY und LÖSCHER 1996).

Strukturformel: $C_2HClBrF_3$

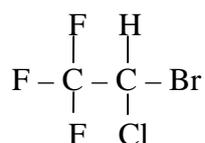


Abb. 06. Chemische Formel von Halothan.

Halothan wird seit 1956 klinisch genutzt und ersetzte den bis dahin vorwiegend verwendeten Äther. Wie Sevofluran ist Halothan eine klare, leicht flüchtige Flüssigkeit, die weder brennbar noch explosiv ist. Halothandampf besitzt einen milden angenehmen Geruch, er reizt die Schleimhäute der Atemwege nicht, dadurch wird er selbst von Kindern gut toleriert. Das Molekulargewicht von Halothan beträgt 197,4 Dalton und das spezifische Gewicht liegt bei 20 °C bei 1,86 g/ml. Der Siedepunkt liegt bei 50,2 °C und der Dampfdruck bei 20 °C beträgt 244,1 mmHg (LARSEN 2001).

Die Aufbewahrung erfolgt in lichtundurchlässigen braunen Flaschen unter Beigabe des Stabilisators Thymol (0,01 %), da Halothan gegenüber Licht nicht stabil ist und bei Lichteinfall in Brom und flüchtige Säuren zerfällt (FORTH et al. 1998).

In Gegenwart von Wasserdampf korrodiert Halothan Metalle, es greift Gummi und Kunststoffbeläge der Narkosegeräte an und führt so zu einem schnelleren Verschleiß dieser Teile (TARG et al. 1989).

2.6.3.2 Pharmakokinetik

Halothan besitzt wie alle halogenierten Inhalationsanästhetika einen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten von 2,35. Da Halothan neben Fluor auch noch ein Brom- und ein Chloratom enthält, besitzt es eine höhere Fettlöslichkeit und damit eine längere Eliminationszeit im Vergleich zu Sevofluran (FREY und LÖSCHER 1996).

Bis zu 80 % der Substanz verlassen den Organismus unverändert über die Lunge, der Rest wird in der Leber über das Zytochrom P₄₅₀ System metabolisiert. Hauptmetabolit ist die

Trifluoressigsäure, weitere Metaboliten sind Chlorid, Fluorid und Bromid, deren Eliminierung über die Nieren erfolgt (LARSEN 2001).

2.6.3.3 Pharmakodynamik

Der MAC₅₀ von Halothan beträgt beim Menschen 0,8. Damit ist diese Substanz ein potentes Anästhetikum. Es wirkt dosisabhängig stark atemdepressiv und vasodilatierend. Verbunden mit dem Blutdruckabfall kommt es zu einer reduzierten Durchblutung aller Organe. Am Herzen ruft es eine negativ-inotrope Wirkung hervor und vermindert das Schlagvolumen. In Gegenwart von Katecholaminen entstehen ventrikuläre Extrasystolen (LARSEN 2001). Halothan wird in der Neuro-Anästhesiologie kaum mehr eingesetzt, da es von allen Inhalationsanästhetika die stärkste vasodilatierende Wirkung besitzt, mit der Folge einer dosisabhängigen Steigung der Gehirndurchblutung. Es kommt zu einer Erhöhung des Blutvolumens im Gehirn mit der Folge, dass der intrakranielle Druck steigt (DRUMMOND und SHAPIRO 1990).

Halothan gehört zu den mit Brom halogenierten Kohlenwasserstoffen und ist dadurch beim Entweichen in die Atmosphäre umweltschädlich. Es trägt zur Zerstörung der Ozonschicht bei und fördert den Treibhauseffekt (LANGBEIN et al. 1999).

Eine höchst unerwünschte Wirkung ist das Auftreten der "Halothan-Hepatitis" (Häufigkeit 1:100.000), dabei kommt es zur einer massiven Leberzellschädigung durch Nekrosen. Die Mortalitätsrate dieser Erkrankung liegt bei 50 %. Die Anwendung von Halothan sollte deshalb heutzutage vermieden werden, da nach vermehrter Exposition das Risiko einer Hepatitis deutlich ansteigt. Somit sind nicht nur die Patienten, sondern auch die Mitarbeiter in Operationssälen besonders gefährdet, da die Freisetzung von Halothan in der Raumluft in Spuren nicht gänzlich zu vermeiden ist. Die gesetzliche maximale Arbeitsplatzkonzentration für Halothan beträgt 5 ppm (FORTH et al. 1998).

2.6.3.4 Neuroprotektion durch Halothan

Verschiedene Studien können nach zerebraler Ischämie einen verringerten Zellschaden unter einer Halothan-Narkose belegen (WARNER et al. 1991, 1993). Eine Ursache dafür liegt in der Senkung des zerebralen Metabolismus durch Inhalationsanästhetika und dem damit verbundenen geringeren ATP-Verbrauch der Nervenzellen (WERNER et al. 1995).

In der Verminderung endogener Katecholamine vermuten HOFFMAN et al. (1993) einen weiteren Grund für die neuroprotektive Wirkung des Halothan.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, an der Ratte die Wirkung des Inhalationsanästhetikums Sevofluran konzentrationsabhängig im Vergleich zu einer mit Halothan beatmeten Kontroll-Gruppe auf Proliferation und Differenzierung von adulten zerebralen Stammzellen nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie kombiniert mit einem 10-minütigen Blutentzug und anschließender Reperfusion, zu untersuchen. Der postischämische Beobachtungszeitraum beträgt 28 Tage. Gleichzeitig erfolgt mit demselben Modell eine weitere Studie über die Auswirkung des Injektionsanästhetikum S-Ketamin auf die adulte neuronale Geneserate (KAEPPEL, in Vorbereitung).

Der Tierversuch wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (in der Fassung vom 25.05.1998, BGB II S. 1105) von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstierhaltung

Bei den eingesetzten Versuchstieren handelt es sich um 54 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 370 ± 10 g, die unter Standard-Laborbedingungen gehalten werden. Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % wird die Raumtemperatur zwischen 20 und 23 °C aufrecht erhalten. Die Raumbelichtung erfolgt in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, wobei die Intensität in der Helligkeitsphase im Käfig 50 bis 100 Lux erreicht. Der Raum, in dem die Tiere untergebracht sind, unterliegt einer personenlimitierten Zutrittskontrolle. Zur Eingewöhnung werden die Tiere eine Woche lang in Gruppen zu je fünf Tieren in einem Makrolon-Käfig Typ 4 gehalten. Der Käfig wird mit entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe) eingestreut. Das Futter besteht aus speziell für Ratten und Mäuse hergestellten Pellets (Alleinfuttermittel Haltung, Fa. Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Ein ständiger Zugang zu Futter und Trinkwasser wird gewährleistet. Einen Tag vor Versuchsbeginn wird ein Tier aus dem Gruppenkäfig entnommen und in einen Einzelkäfig umgesetzt, der den Tieren aber weiterhin Blickkontakt zu ihren Artgenossen gewährleistet. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wird das Futter entfernt, sodass sich das jeweilige Tier bei Versuchsbeginn in einem niedrigen normoglykämischen Zustand befindet.

3.2.2 Versuchsaufbau

Man unterscheidet drei Versuchsabschnitte: den operativen Teil (I), die In-vivo-Markierung der Stammzellen (II) und die analytische Untersuchung des Gehirns (III).

In Tabelle 02 wird der Versuchsaufbau im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Tab. 02. Zeitlicher Ablauf des Gesamtversuchs

I: Tag 0	Operation (OP): Präparation, Äquilibration, Ischämie, Reperfusion
II: Tag 1-7	Gewichtskontrolle und intraperitoneale Injektion von BrdU 1x täglich zur gleichen Uhrzeit
Tag 8-27	alle 3 Tage Gewichtskontrolle der Tiere
Tag 28	Opferung und Perfusion der Tiere, Gehirnentnahme
III: ab Tag 31	Schneiden der Gehirne, Färbung der Gehirnschnitte und mikroskopische Untersuchung

Darstellung der drei Versuchsabschnitte (I-III) mit Anzahl der benötigten Tage für die verschiedenen Schritte.

3.2.3 Versuchstier-Gruppen

48 der insgesamt 54 Tiere werden nach der Präparation durch Randomisierung in sechs Versuchs-Gruppen eingeteilt. Es gibt drei Ischämie-Gruppen (Gruppe 1-3) und drei Gruppen ohne Ischämie (Gruppe 4-6).

Die Ischämie-Gruppen unterscheiden sich sowohl in der Wahl des Anästhetikums, als auch in dessen Konzentration. Die restlichen Gruppen erhalten die gleichen Anästhetika wie die Ischämie-Gruppen, nur wird keine Ischämie durchgeführt. Diese Gruppen bezeichnet man deshalb als Scheinversuch-Gruppen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

<u>Ischämie (BCAO)</u>	<u>Scheinversuch (SV)</u>
Gruppe 1: Sevofluran 1,4 Vol% BCAO über 10 min	Gruppe 4: Sevofluran 1,4 Vol% kein BCAO
Gruppe 2: Sevofluran 2,8 Vol% BCAO über 10 min	Gruppe 5: Sevofluran 2,8 Vol% keine BCAO
Gruppe 3: Halothan 0,8 Vol% BCAO über 10 min	Gruppe 6: Halothan 0,8 Vol% keine BCAO

Abb. 07. Gruppeneinteilung.

*Gruppeneinteilung der Tiere, die in den operativen Teil eingehen (n = 8 pro Gruppe).
BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis*

Um die gewonnenen Ergebnisse mit den Werten eines unbehandelten Tieres vergleichen zu können, gibt es eine Nativ-Gruppe (Gruppe 7), die aus 8 weiteren Tieren besteht. Diese Tiere werden zur In-vivo-Markierung 7 Tage lang mit BrdU gespritzt, sie werden aber keinem operativen Eingriff unterzogen, sondern sollen physiologische Referenzwerte liefern.

3.2.4 Versuchsvorbereitung von Abschnitt I

Da nur klinisch gesunde Tiere in den Versuch eingehen dürfen, beobachtet man zuerst das Verhalten der Ratte im Käfig, im Anschluss daran folgt eine kurze Allgemeinuntersuchung. Ein Glaszylinder mit Deckel wird mit Zellstoff ausgelegt und anschließend mit ca. 5 ml Sevofluran getränkt. Die Ratte wird aus dem Käfig entnommen und in den Glaszylinder gesetzt. Nach Eintreten der Bewusstlosigkeit kann das Tier mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops endotracheal intubiert werden. Als Tubus dient ein 5 cm langes Stück eines Venenkatheters (Cavafix Certo, 18 G, Braun AG, Melsungen).

3.2.5 Narkose

Nach Fixierung des Tubus wird die Ratte an ein Überschuss-System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von ca. 2 l/min und einer Narkosegas-Absaugung angeschlossen. Die Beatmung des Tieres übernimmt ein Beatmungsgerät (Harvard Rodent Ventilator, Modell 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Massachusetts, USA). Die Narkose während der Präparation ist bei allen Tieren gleich und besteht aus Halothan (Forene, Abbot GmbH, Wiesbaden) in einer Konzentration von 1,3 bis 1,6 Vol% und aus einem Sauerstoff/Luft-Gemisch im Verhältnis 1:2 (inspiratorische Sauerstofffraktion $FiO_2 = 0,33$).

3.2.6 Installation der Messsonden

Zur Vermeidung einer Hypothermie wird sowohl die perikranielle als auch die rektale Temperatur kontinuierlich ermittelt. Da die rektale Temperatur nicht immer der perikraniellen Temperatur entspricht, wird in den M. temporalis knochennah eine Temperatursonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co, Stanford CT, USA) eingestochen. Fällt die Gehirntemperatur des Tieres unter 37,3 °C, schaltet sich über ein automatisches Rückkopplungssystem eine Rotlichtlampe ein, steigt die Temperatur über 37,8 °C schaltet sich die Lampe wieder aus. Zur Messung der Körpertemperatur wird zusätzlich eine Messsonde ca. 1 cm in das Rektum eingeführt.

Zur Messung der Herzfrequenz wird ein Elektrokardiogramm (EKG, Cadiocap II, Datex, Helsinki, Finland) abgeleitet. Dazu werden zwei Nadelelektroden links und rechts vom Sternum subkutan platziert. Das Ablesen der Herzfrequenz erfolgt durch Anlegen eines EKG-Lineals.

Die Sichtbarmachung der Hirnaktivität gelingt mit einem Elektroenzephalogramm (EEG, Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM 205-3, Frankfurt). Je zwei Elektroden werden über der parietalen und frontalen Hirnregion jeder Seite subkutan eingestochen. Zusätzlich bringt man eine Erdungselektrode an der Schwanzbasis an. Das gemessene EEG wird auf einen Monitor übertragen und die gewonnenen Daten kontinuierlich überwacht.

3.2.7 Präparation der Gefäßzugänge

Vier Polyethylenschläuche, mit einem Außendurchmesser von 0,97 mm und einem Innendurchmesser von 0,58 mm bei einer Länge von 33,5 cm, spült man mit einer mit Heparin (Liquemin F, Bode, Grenzach-Wyhlen) versetzten Infusionslösung (Thomaejonin, Braun AG, Melsungen) durch, um der Bildung eines Thrombus entgegenzuwirken. Die Dosierung beträgt 1000 I.E. Heparin auf 500 ml. Das Tier wird in Rückenlage gedreht sowie beide Halsregionen und die rechte Inguinalregion anschließend rasiert und desinfiziert (Cutasept, Bode, Hamburg). Bevor man die Haut durch eine ca. 1 cm lange Inzision mit einem Skalpell eröffnet, wird die Schnittstellen mit Bupivacain 0,5 %, (Curasan, Pharma AG, Kleinostheim) unterspritzt. Durch schonende stumpfe Präparation des Fettgewebes zur Seite, gelingt es die *A. femoralis*, die *V. femoralis* und den *Nervus (N.) femoralis* getrennt von einander darstellen zu können. Mit Hilfe einer manuell vorgebogenen Kanüle (Microlance, 24 G, 0,55 x 25 mm) kann nun die *A. femoralis* eröffnet werden. Ein angespitzter Katheter wird unter der Kanülenspitze ca. 2 cm weit in die Öffnung vorgeschoben und in dieser Position fixiert. Dieser Katheter dient zur arteriellen Blutdruckmessung und zur Entnahme von

Blutproben zur Blutgasanalyse. Den Blutglukosegehalt analysiert ein Schnelltestgerät (Glukometer Elite, Bayer Diagnostics, München). Der Katheter wird an ein Druckdom (MX 960, Medexmedical, Lancashire, England) angeschlossen, welcher wiederum mit dem Blutdruckmessgerät (Cardiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) verbunden ist. In gleicher Weise wird die *V. femoralis* katheterisiert, nur dass anstelle des spitzen Katheters ein stumpfer verwendet wird. Der für die Ischämie nötige Blutentzug erfolgt über diesen Zugang. Gegen Ende der Ischämie wird das Blut auf demselben Weg wieder zurückgegeben. Als nächstes eröffnet man die rechte Halsregion, um die *V. jugularis* im *Sulcus jugularis* freizulegen. In diese Vene legt man zwei weitere Katheter, sie dienen zur späteren Gabe von Fentanyl (Fentanyl, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) als Analgetikum und Norepinephrin (Arterenol, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) zur Blutdruckstabilisierung. Um beide *Aa. carotides communes* identifizieren zu können, orientiert man sich an der Trachea und am *Truncus vagosympatikus*. Damit der Operateur diese Gefäße später leichter wieder auffindet, wird jeweils ein Gummiband (Ethicon, Norderstedt) unter diesen durchgeführt. Die Präparationszeit beträgt ca. 90 min.

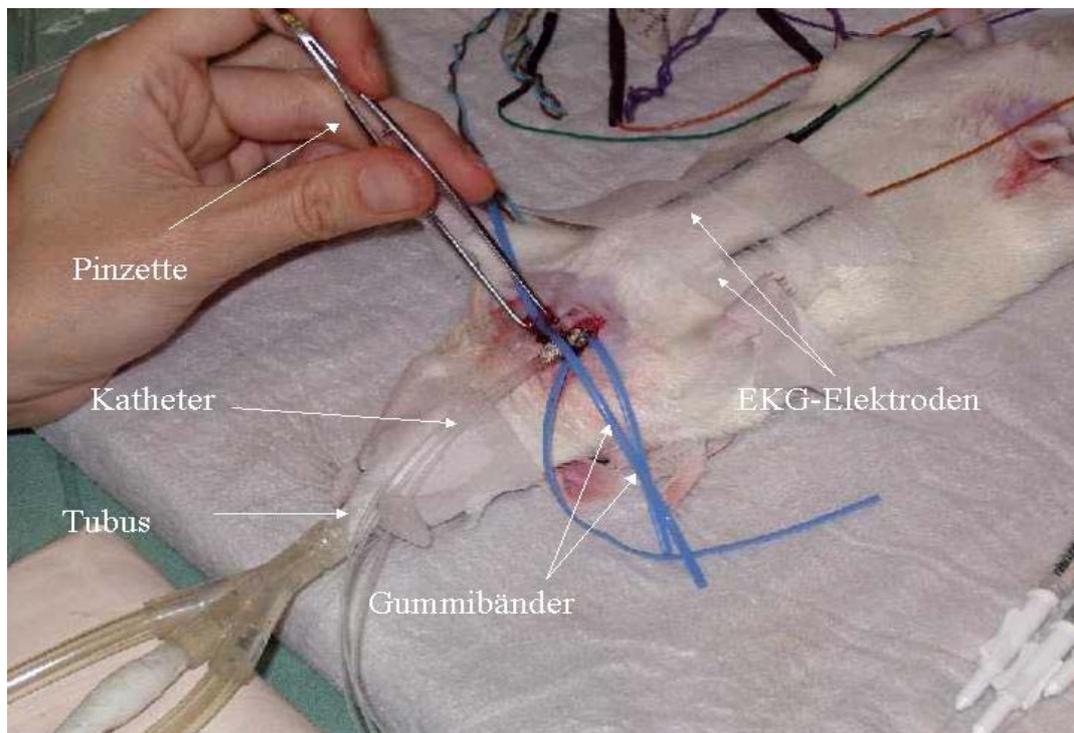


Abb. 08. Unterlegung der *Aa. carotides* mit Gummibändern.

3.2.8 Narkoseumstellung

Je nach Gruppenzugehörigkeit des Tieres wird nach Abschluss der Präparation die Narkose auf das entsprechende Anästhetikum in der entsprechenden Konzentration umgestellt. Die

Tiere der Gruppen 3 und 6 werden von nun an bis Versuchende mit einer Halothankonzentration von 0,8 Vol% beatmet. Bei den Gruppen 1, 2, 4, und 5 wird der Halothan-Verdampfer durch einen Sevofluran-Verdampfer ausgetauscht. Tiere der Gruppe 1 und 4 erhalten eine bis Versuchende durchgehende Konzentration von 1,4 Vol% Sevofluran, Gruppe 2 und 5 dagegen eine Konzentration von 2,8 Vol% Sevofluran. Das Sauerstoff/Luft Gemisch im Verhältnis von 1:2 ($FiO_2 = 0,33$) wird beibehalten.

Ab diesem Zeitpunkt erhalten alle Tiere zusätzlich über einen Perfusor (Spritzenpumpe Modell 11, Harvard Apparatus, USA) 0,01 mg/kg/h Fentanyl über die *V. jugularis* zur Analgesie.

3.2.9 Äquilibrierungsphase

Nach Umstellung der Narkose beginnt die Äquilibrierungsphase. In dieser Zeit soll sich das Tier von der Präparation und der Narkoseumstellung erholen (steady state). Mit einer wirkungsabhängigen Dosis von Norepinephrin wird ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von 100 mmHg eingestellt. Dies ist notwendig, da die verschiedenen Inhalationsanästhetika den Blutdruck unterschiedlich beeinflussen. Die Äquilibrierungszeit beträgt genau 30 min. Gegen Ende der Äquilibrierung werden die ersten physiologischen Messparameter (1. Messung) gewonnen und schriftlich festgehalten.

3.2.10 Blutentzug

Es folgt die Phase des Blutentzugs. Über einen Zeitraum von 8 min wird der MAP durch Blutentzug über den Katheter in der *V. femoralis* auf 40 mmHg gesenkt.

Das Blut wird dem Tierkörper langsam entzogen und in heparinisierten 5 ml Spritzen (Fa. Braun AG, Melsungen) bis zur Reinfusion bei Körpertemperatur aufbewahrt. Die entzogene Blutmenge ist von Tier zu Tier unterschiedlich und beträgt ca. 8 ml.

3.2.11 Ischämie

Die zerebrale Ischämie wird in diesem Versuch durch einen Verschluss der rechten und linken *A. carotis communis* mit zwei Gefäßclips über 10 min in Kombination mit einer hämorrhagischen Hypotension durch Blutentzug erzielt. Sobald die Clips gesetzt sind, beginnt die 10-minütige Ischämiephase. Der MAP wird durch Gabe oder durch weiteren Entzug kleinster Blutmengen aus der *V. femoralis* konstant auf dem Zielwert von 40 mmHg gehalten. Mit der Dokumentation der Messparameter (2. Messung) endet diese Phase.

3.2.12 **Reperfusion**

Zu Beginn der Reperfusionsphase werden die Clips entfernt und anschließend die vorher entzogene Blutmenge über 15 min reinfundiert. Um eine CO₂-Anreicherung durch das venöse Blut zu vermeiden, wird die Beatmungsfrequenz kurzfristig erhöht. Am Schluss der 15-minütigen Phase werden ein weiteres Mal die Messparameter ermittelt (3. Messung) und dokumentiert.

3.2.13 **Erholung**

Nach vollständiger Reinfusion des entnommenen Blutes schließt sich die Erholungsphase an. Die Stabilisierung des Kreislaufes erfolgt dadurch, dass keinerlei Manipulationen mehr an der Ratte vorgenommen werden. Hat sich der Kreislauf stabilisiert, erfolgt die letzte Messung der physiologischen Parameter (4. Messung). Die Erholungszeit beträgt 30 min.

3.2.14 **Versuchsende von Abschnitt I**

Alle Katheter werden nun vorsichtig entfernt und die Hautwunden mit nicht-resorbierbaren Fäden (4/0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Auch sämtliche Messsonden werden entfernt. Alle Tiere erhalten eine subkutane Gabe von 5 ml angewärmter Infusionslösung um den unvermeidlichen Flüssigkeitsverlust während des Versuchs auszugleichen. Nach Abstellen der Inhalationsanästhetikazufuhr wird mit 100 % Sauerstoff bis zum Einsetzen der Spontanatmung beatmet, daraufhin erfolgt die Extubation. Ist das Tier wach, wird es in seinen Käfig gesetzt und unter Warmhaltung beobachtet. Sobald sich die Ratte von der Anästhesie erholt hat, wird es in den Tierstall zurückgebracht. Man rechnet für diese Phase mit ca. 60 min.

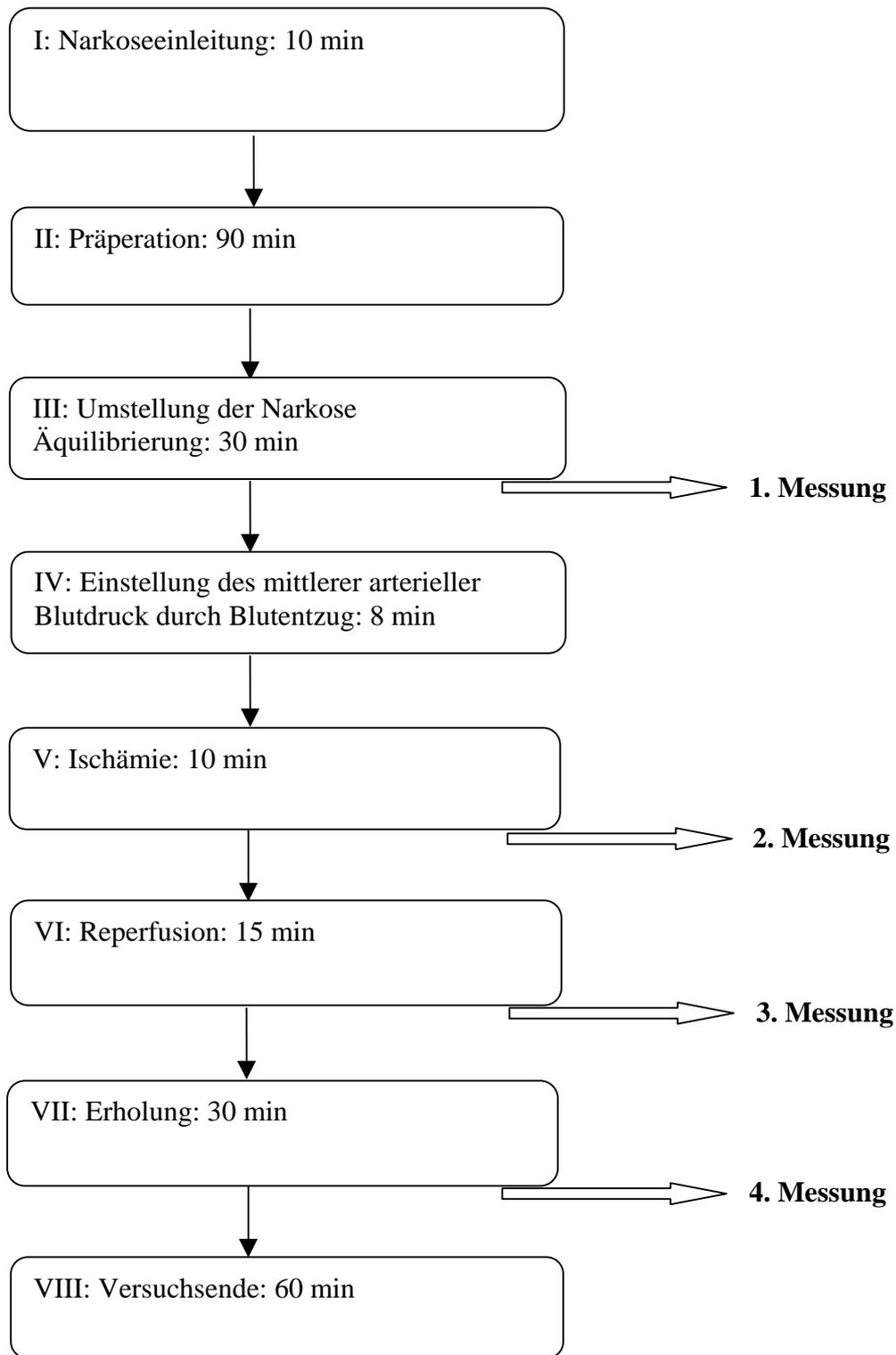


Abb. 09. Zeitlicher Verlauf der einzelnen Phasen (I-VIII) der Operation in der Übersicht.

3.2.15 Physiologische Parameter

In einem Verlaufsprotokoll werden die während der verschiedenen operativen Phasen gewonnenen Messwerte festgehalten. Der erste Messwert am Ende der Äquilibrierungsphase dient als Ausgangswert (AW) für die Beurteilung aller weiteren Werte.

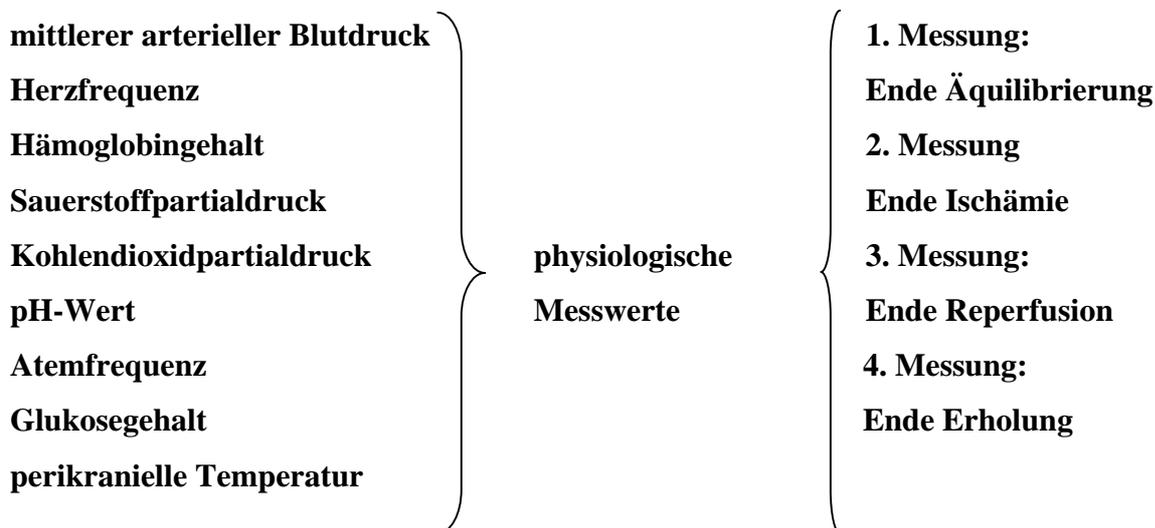


Abb. 10. Überblick über Messwerte und Messzeitpunkte während der Operation.

3.2.16 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU)-Applikation

BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das statt Thymidin in die DNS von mitotisch aktiven Zellen eingebaut wird, es dient zur Markierung von sich teilenden Zellen (In-vivo-Markierung der Stammzellen).

Jedem Tier werden an sieben aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend einen Tag nach der Operation, täglich jeweils zur gleichen Uhrzeit 100 mg/kg KGW BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin, Sigma, Steinheim) bzw. 5ml/kg (bei einer Konzentration von 20 mg/ml) intraperitoneal gespritzt. Dazu wird das Pulver in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst, auf 37 °C erhitzt und anschließend gefiltert. Das aktuelle Körpergewicht der Tiere wird vor dem Spritzen ermittelt. Die Injektionen werden abwechselnd von zwei Tierärzten durchgeführt, ein Tierpfleger hält das Tier dabei in Rückenlage. Nach diesen sieben Tagen werden die Tiere jeden dritten Tag gewogen und ihr Gesundheitszustand kontrolliert.

3.2.17 Perfusion

Nach 28 Tagen werden die Tiere getötet, mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lsg., eigene Herstellung) perfundiert und das Gehirn zur Untersuchung entnommen.

Die Ratte wird in tiefe Narkose gelegt indem sie wieder in einen mit Halothan getränkten Glaszylinder verbracht wird. Dann werden die Tiere intubiert und beatmet. Die Halothankonzentration wird auf 4 Vol% eingestellt. Sobald das Tier keinerlei Reflexe mehr zeigt, wird über einen Bauchschnitt das Abdomen eröffnet. Das Zwerchfell wird aufgeschnitten und die Rippen beiderseits mit einer Schere durchtrennt, bis das Sternum nach kranial aufgeklappt werden kann. Eine Schmetterlingskanüle (Venofix, Braun, Melsungen) wird in die linke Herzkammer eingestochen und dort mit einer Moskitoklemme befestigt. Anschließend wird die Leber eingeschnitten. Sitzt die Kanüle im Herzen an der richtigen Stelle, tritt die perfundierte Flüssigkeit, nachdem sie durch den gesamten Körper geströmt ist, aus der eingeschnittenen Leber wieder aus. Zuerst werden langsam 100 ml NaCl-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg) über einen Zeitraum von 10 min perfundiert, um ein Entbluten des Tieres zu erreichen. Im Anschluss daran werden ebenfalls über 10 min 100 ml 4%iges Paraformaldehyd perfundiert.

3.2.18 Entnahme des Gehirns

Nach vollständiger Perfusion wird der Kopf des Tieres durch einen Genickschnitt mit der Schere vom Tierkörper abgetrennt. Die Kopfhaut und der M. temporalis werden soweit wie möglich entfernt bis der Schädelknochen frei liegt. Dieser muss vorsichtig mit einer Hohlmeißelzange Stück für Stück abpräpariert werden. Um das Gehirn aus seiner knöchernen Umgebung lösen zu können, durchtrennt man mit einem Spatel alle rostralen und kaudalen Gehirnnerven. Liegt das Gehirn frei, wird das nicht benötigte Kleinhirn mit einem Skalpell abgetrennt und das restliche Gehirn in ein mit 4 % PFA gefülltes Glasgefäß überführt und bei -4 °C gelagert. Nach 24 h wird das Gehirn in ein weiteres, mit 30%iger Saccharose-Lösung. (eigene Herstellung) gefülltes Glasgefäß eingelegt. Hierin muss es mindestens 2 weitere Tage zur Fixierung lagern, bevor es geschnitten werden kann.

3.2.19 Schneiden des Gehirns

Das Gehirn wird aus der Saccharoselösung entnommen und mit einem Skalpell sagittal in zwei Hälften geteilt. Beide Hälften werden mit Hilfe eines Einbettmediums (Tissue Freezing Medium, Leica Instruments, Nussloch) 96 % Ethanol und Trockeneis auf der Schnittunterlage des Schlittenmikrotoms (Schlittenmikrotom Hn 40, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) so befestigt, dass die mediale Seite auf der Unterlage zu liegen kommt. Sobald das Gehirn komplett durchgefroren ist, kann mit dem Schneiden begonnen werden. Ab einem festgesetzten Startpunkt (kurz vor Beginn der Hippokampusformation) beträgt die Schnittdicke konstant 40 μm . Jeder einzelne Schnitt wird mit einem feinen Pinsel in vorbereitete, mit Kryoprotektionslösung (eigene Herstellung) gefüllte Eppendorfgefäße (2 ml, Fa. Eppendorf Netheler-Hinz, Hamburg) überführt. Pro Gehirnhälfte stehen je 10 durchnummerierte Eppendorfgefäße zur Verfügung, welche der Reihe nach abwechselnd befüllt werden, solange bis das Hirn komplett geschnitten ist. In einem Karton werden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.



Abb. 11. Schneiden der beiden Gehirnhälften mit dem Schlittenmikrotom.

3.2.20 Untersuchung des Gehirns

Informationen über alle verwendeten Antikörper, Chemikalien, Lösungen, Materialien und Geräte werden gesammelt am Schluss dieses Kapitel in einer Liste aufgeführt.

3.2.21 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Um den histopathologischen Schaden beurteilen zu können, werden die Schnitte im Free-Floating-Verfahren (freischwimmend) mit Hämatoxylin und Eosin nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 10 min auftauen bei Raumtemperatur
- 15 min waschen in 0,1 molarem (M) Phosphatpuffer (PO₄) plus 10 µl Triton X
- 15 min Leitungswasser
- 10 min doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O)
- jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufziehen und 30 min lufttrocknen
- absteigende Alkoholreihe:
- zweimaliges kurzes eintauchen in ddH₂O
- 2 min Hämalaun
- 10 min fließendes kaltes Leitungswasser
- zweimaliges kurzes eintauchen in ddH₂O
- 1 min Eosin (wässrige Eosin-Dinatrium Lösung)
- schwenken in ddH₂O
- aufsteigende Alkoholreihe
- 2 min Rotihistol
- 5 min Rotihistol
- eindecken mit Roti-Histokit

Erklärung:

Zur Durchführung dieser Färbung werden zwei Eppendorfgefäße aus dem Tiefkühlschrank entnommen und 10 min lang bei Raumtemperatur aufgewärmt. Es folgt ein 15-minütiger Waschgang in 0,1 M PO₄ und 10 µl Triton X. Darauf folgen erst 15 min waschen in Leitungswasser und dann 10 min waschen mit doppelt destilliertem Wasser.

Jetzt können jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen werden und danach für 30 min luftgetrocknet werden. Nach der Lufttrocknung werden die Schnitte durch die absteigende Alkoholreihe geführt. Bevor die Schnitte in die Farblösung verbracht werden, erfolgt noch ein zweimaliges kurzes Eintauchen in ddH₂O. Man gibt nun die Objektträger für

2 min in Hämalun (nach Mayer). Anschließend setzt man die Schnitte 10 min lang unter fließendes kaltes Leitungswasser. Gleich darauf erfolgt eine einminütige Gegenfärbung mit Eosin. Die Schnitte werden mit ddH₂O von der überschüssigen Farbe befreit und gehen nun in die aufsteigende Alkoholreihe. Ist die aufsteigende Alkoholreihe beendet, werden die Objektträger erst für 2 min in Rotihistol, danach nochmals für 5 min in ein neues Glasgefäß mit Rotihistol verbracht. Erst jetzt können die Gehirnschnitte mit Roti Histokitt eingedeckt werden.

Zum Schluss erfolgt eine Beschriftung der Objektträger mit Tiernummer und Datum der Färbung. Am nächsten Tag sind diese getrocknet und können bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen aufbewahrt werden.

3.2.21.1 Klassifizierung des Schadens

Die HE-Färbung dient zur Ermittlung der vorhandenen neuronalen Schädigung im Hippokampus am Tag 28 nach Versuchsbeginn.

In Anlehnung an MIURA et al. (1998) und SANO et al. (1992) werden die verschiedenen Schadenklassen der CA1-Region und der CA3-Region einem Punktesystem zugeordnet. Die verschiedenen Regionen werden in 100-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop einzeln bewertet. Pro Tier wird jeder Schnitt des rechten und linken Gyrus dentatus aus einem Eppendorfgefäß mit dem Lichtmikroskop betrachtet (ca. 7 bis 10 Schnitte, je nach Größe des Hippokampus).

Folgende Punkteskala wird verwendet:

0 = kein histologischer Schaden (s.Abb. 15)

1 = 1-10 % geschädigte Neuronen, geringe eosinophile Zellschädigung, Zellband geschlossen

2 = 10-50 % geschädigte Neuronen, deutliche eosinophile Zellschädigung, Zellband lückenhaft

3 = 50-100% geschädigte Neuronen, massive eosinophile Zellschädigung, Zellband zerstört (s.Abb. 14)

3.2.21.2 Auswertung

Die Gesamtpunktzahl eines jeden Tieres wird für jede Region durch Addition der jeweiligen Einzelwerte ermittelt und anschließend durch die Gesamtzahl der verwendeten Schnitte dividiert. Für die verschiedenen Tiergruppen berechnet man sowohl die Mittelwerte (MW) als auch die Standardabweichungen (SD) der ermittelten Werte.

3.2.22 Flächenbestimmung des Gyrus dentatus

Mit Hilfe der HE-Schnitte wird neben der Schadensklassifizierung auch eine computergestützte Flächenbestimmung des Gyrus dentatus ermöglicht. Mit folgender Ausrüstung wird gearbeitet:

Computer (Komplettrechner P4, 512 MB RAM, 80 GB HDD, Intel CPU 2,66 GHZ) und Monitor (21“Samsung-Monitor) von der Firma IS-Computersysteme, Erding.

Software (Image-Pro Express Version 4.5), Kamera (Evolution MP Digital Color Kit) und Leuchtfeld (LED-Leuchtfeld für homogenes Durchlicht, 83x75 mm²) von der Firma Weiss, Imaging and Solutions GmbH, Günding/ Bergkirchen.

Sowohl für die rechte Gehirnhälfte als auch für die linke Gehirnhälfte werden jeweils alle Schnitte aus einem Eppendorfgefäß ausgewertet. Ein Objektträger mit jeweils zwei Gehirnschnitten einer Seite wird auf das Leuchtfeld gelegt und mit homogenem Durchlicht beleuchtet. Über diesem Leuchtfeld befindet sich eine Kamera, die mit dem Computermonitor verbunden ist, auf welchem dann die Gehirnschnitte abgebildet werden. Vor jeder Auswertung wird der Computer auf 1 mm kalibriert. Nach optimaler Einstellung des Bildes durch das Kameraobjektiv wird ein Bild von jedem Schnitt angefertigt, welches nun am Computer bearbeitet werden kann. Der Gyrus dentatus wird soweit vergrößert, dass ein problemloses Umfahren der Grenzflächen am Monitor möglich ist. Die Flächenbestimmung erfolgt automatisch durch die Software, sobald der Gyrus dentatus komplett umfahren ist.

3.2.22.1 Auswertung

Mit Hilfe der ermittelten Flächenwerte erfolgt eine Berechnung des Gesamtvolumens des Gyrus dentatus für das gesamte Gehirn nach der Formel:

Flächenwert (in mm) x Gewebeschnittdicke (0,04 mm) x Anzahl der Eppendorfgefäße (10)

Jeder Einzelwert wird in eine Excel-Tabelle eingetragen. Am Schluss werden alle Werte addiert, sodass man für jede Gehirnhälfte die Gesamtfläche erhält. Für die verschiedenen Tiergruppen berechnet man sowohl die Mittelwerte (MW) als auch die Standardabweichungen (SD) der ermittelten Werte.

3.2.23 BrdU- Färbung

Mit der immunhistochemischen BrdU-Färbung können alle Zellen, die sich im Zeitraum der 7-tägigen BrdU Applikation neu gebildet haben, schwarz angefärbt werden. Ein primärer monoklonaler Antikörper bindet sich an das BrdU und bildet so einen Antikörper-Antigen-Komplex. Mit Hilfe eines sekundär Antikörpers, einer Enzymreaktion und eines Farbstoffes können die gebundenen Antikörper für das Auge sichtbar gemacht werden.

Die Gehirnschnitte der rechten und linken Hemisphäre durchlaufen den 2-tägigen Färbedurchgang getrennt voneinander, immer nachdem selben Protokoll:

- 3 x 10 min waschen mit Trizma Base Solution (TBS)
 - 30 min inkubieren mit 0,6 % H₂O₂
 - 3 x 10 min waschen mit TBS
 - 90 min inkubieren in 50 % Formamide bei 65 °C
 - 5 min in 2 M Natriumcitrat Lösung (SSC)
 - 30 min inkubieren in 2 M HCl bei 38 °C
 - 10 min in 0,1 M Boratpuffer
 - 4 x 5 min waschen mit TBS
 - 30 min blockieren mit 3 % Donkey Serum
 - über Nacht inkubieren mit Mouse-anti-BrdU-Antikörper (1:500)
1. Tag
-
- 8 x 5 min waschen mit TBS
 - 4 h inkubieren mit Donkey-anti-mouse-Antikörper (1:500)
 - 8 x 5 min waschen mit TBS
 - 1 h inkubieren mit Avidin-Biotin-Peroxidase
 - 6 x 5 min waschen mit TBS
 - 5 min färben mit DAB
 - 4 x auswaschen mit Leitungswasser
 - 4 x 5 min waschen mit TBS
 - Aufziehen auf Objektträger
 - eintauchen in Neo-Clear und eindecken
2. Tag

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Erklärung:

Die Schnitte werden im Free-Floating-Verfahren gefärbt. Dazu werden die Eppendorfgefäße bei -20 °C entnommen und in 10 min auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Petrischale wird mit 0,1 M PO₄ gefüllt, zur Reduzierung der Oberflächenspannung wird noch 1 Tropfen 10%iges Triton X dazugegeben. Sind die Schnitte in die Petrischale überführt, können sie aussortiert werden. Mit einem feinen Pinsel überführt man die Schnitte in eine 6 Well-Platte (maximal 10 Schnitte pro Well) und wäscht sie auf der Schüttelmaschine für 3 x 10 min in Trizma Base Solution (TBS). Um endogene Peroxidasen zu blockieren, erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 0,6 % Wasserstoff-Peroxid (H₂O₂).

Erneut werden die Schnitte zu Waschzwecken für weitere 3 x 10 min in TBS gesetzt. Während dieser Zeit wird ein Wärmeinkubator auf 65 °C vorgeheizt. Nach dem Waschen werden die Schnitte für 90 min bei 65 °C mit 50 % Formamide und gleich danach für 5 min mit eine 2 M Natriumcitrat Lösung (SSC) inkubiert.

Der Inkubator wird dann auf 38 °C runtergekühlt, es folgt für weitere 30 min die Inkubation in 2 M Salzsäure (HCl). Zur Neutralisation des pH-Wertes schwimmen die Schnitte dann in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur. Danach wird für 4 x 5 min ein weiterer Waschdurchgang angeschlossen. Bevor der Antikörper dazugegeben werden kann, erfolgt mit Hilfe von 3%igem Donkey Serum ein 30-minütiger Blockierungsschritt. Durch die Blockierung von Proteinen erzielt man eine bessere spezifische Bindung des Antikörpers an das gesuchte Antigen und erreicht so eine geringere Hintergrundanfärbung. In der Zwischenzeit wird der erste Antikörper vorbereitet.

Die primäre Antikörpermischung setzt sich wie folgt zusammen:

- 7664 µl TBS/ 240 µl 3%iges Donkey Serum/ 80 µl 0,1 % Triton X
- 16 µl Monoclonal Rat anti-Bromodeoxuridine-Antikörper (1:500)

Der erste Antikörper inkubiert bei 4°C über Nacht in einer 36-Well- Platte.

Der nächste Tag beginnt wieder mit 8 x 5 min waschen in TBS, um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen, bevor mit dem zweiten Antikörper über einen Zeitraum von vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die sekundäre Antikörpermischung setzt sich wie folgt zusammen:

- 7664 µl TBS, 240 µl 3%iges Donkey Serum, 80 µl 0,1 % Triton X
- 16 µl Donkey anti-mouse (1:500)

Es folgt wieder ein Waschgang für 8 x 5 min. In dieser Zeit wird die für den nächsten Schritt nötige Avidin-Biotin-Peroxidase-Lösung (7840 µl TBS, 40 µl Lösung A, 40 µl Lösung B)

angemischt, in welcher die Schnitte 60 min inkubieren. Als nächstes wird 6 x 5 min lang mit TBS gewaschen.

Nun werden die Schnitte für 5 min einem DAB-NiCl₂-H₂O₂ Gemisch ausgesetzt, wodurch eine Schwarzfärbung des Gewebes stattfindet. Nach mehrmaligem kurzen eintauchen in Leitungswasser, wird die überschüssige Farbe durch einen 20-minütigen Waschgang gründlich entfernt. Zum Aufziehen werden die Schnitte in eine mit 0,1 M PO₄ gefüllte Petrischale verbracht, in die zur Reduzierung der Oberflächenspannung ein Tropfen Triton X zugefügt wird. Mit einem feinen Pinsel werden je zwei Gehirnschnitte auf einen beschrifteten Objektträger aufgezogen, welcher für 5 min schräg aufgestellt wird, damit die Flüssigkeit ablaufen kann. Nach ca. 10 min sind die Schnitte ausreichend luftgetrocknet und können nun mit Hilfe eines Objektträgerhalters in eine mit Neo Clear gefüllte Glasküvette eingetaucht werden, bevor sie mit Neo Mount eingedeckt werden.

Die Objektträger werden bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen aufbewahrt.

3.2.23.1 Lichtmikroskopie

Pro Tier wird jeder Schnitt des rechten und linken Gyrus dentatus aus einem Eppendorfgefäß mit dem Lichtmikroskop betrachtet. Zuerst werden in 250-facher Vergrößerung die Schnitte im Ganzen betrachtet, um den Gyrus dentatus leichter aufsuchen zu können. Danach wird in 400-facher Vergrößerung der Beginn des Gyrus dentatus im Blickfeld eingestellt. Während der Gyrus dentatus komplett angeschaut wird, werden alle BrdU positive Zellen, welche sich schwarz darstellen, gezählt. Durch weitere Feineinstellung mit der Mikrometerschraube wird eine Unterscheidung der angefärbten Zellen von Färbeartefakten erleichtert.

Die Anzahl der Zellen wird für jeden Schnitt in ein Protokoll eingetragen.

3.2.23.2 Auswertung

Durch Addition der Einzelwerte und Multiplikation mit 10 (= Anzahl der Eppendorfgefäße) wird die Gesamtanzahl der vorhandenen BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus 28 Tage nach Versuchsbeginn sowohl für die rechte, als auch für die linke Gehirnhälfte ermittelt. Für die verschiedenen Tiergruppen berechnet man sowohl die Mittelwerte (MW), als auch die Standardabweichungen (SD) der ermittelten Werte.

3.2.24 Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit Fluoreszeinthiocyanat (FITC) und Neuronal nuclear protein (NeuN)

Das Prinzip der Immunfluoreszenz-Färbung beruht auf der Möglichkeit, Fluorochrome an Antikörper zu koppeln und dadurch Antigen-Antikörper Reaktionen in histologischem Schnitt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

sichtbar zu machen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung wird das gesuchte Antigen mit dem Primärantikörper markiert und mit Hilfe des fluoreszierenden sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. Um die in der BrdU-Färbung positiv angefärbten Zellen differenzieren zu können, wird eine Immunfluoreszenz-Färbung im Free-Floating-Verfahren durchgeführt. Die Schnitte werden im selben Färbegang einem Marker für Neuronen (NeuN) und einem Marker für BrdU-positive Zellen (Anti-Bromodeoxyuridine) ausgesetzt, deren sekundäre Antikörper durch verschiedene Wellenlängen angeregt werden und so mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Die Gehirnschnitte der rechten und linken Hemisphäre durchlaufen den 2-tägigen Färbedurchgang getrennt voneinander, immer nach dem selben Protokoll:

- 3 x 10 min waschen mit TBS
 - 90 min inkubieren in 50 % Formamide bei 65 °C
 - 5 min in 2 M SSC
 - 30 min inkubieren in 2 M HCl bei 38 °C
 - 10 min in 0,1 M Boratpuffer
 - 4 x 5 min waschen mit TBS
 - über Nacht inkubieren mit Rat-anti-BrdU-AK (1:500) und Mouse-anti-NeuN-Antikörper (1:250) bei 4 °C
- } 1. Tag
-
- 3 x 10 min waschen mit TBS
 - 4 h inkubieren mit Donkey-anti-rat-FITC-Antikörper (1:500) und Donkey-anti-mouse-ROX-Antikörper (1:500) bei Raumtemperatur
 - 5 x 15 min waschen mit TBS
 - Eindecken mit Vektor Shield
- } 2. Tag

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Erklärung:

Die bei -20 °C in Eppendorfgläsern gelagerten Gehirnschnitte werden über einen Zeitraum von 10 min der Raumtemperatur angeglichen. Danach werden die Schnitte in einer mit 0,1 M PO₄-Puffer plus einem Tropfen Triton X gefüllten Petrischale aussortiert, da nur die Gehirnschnitte gefärbt werden, die den Gyrus dentatus enthalten. Alle auswertbaren Schnitte kommen in eine 6 Well-Platte (maximal 10 Schnitte pro Well) und werden 3 x 10 min lang mit TBS gewaschen. Daran schließt eine 90-minütige Inkubation in 50 % Formamide bei einer Temperatur von 65 °C an. Das Formamide bewirkt eine Aufspaltung der DNS.

Nach weiteren 5 min in 2 M SSC Lösung inkubieren die Schnitte 30 min lang in 2 M HCl bei einer Temperatur von 38 °C. Dieses Verfahren bereitet die DNS-Proteine vor, um eine bessere Antikörperbindung zu ermöglichen.

Ein anschließendes Bad in 0,1 M Boratpuffer (pH von 8,5) für 10 min dient der Neutralisation des pH-Wertes. Nun werden die Schnitte 4 x 5 min mit TBS gewaschen, bevor sie mit der primären Antikörpermischung in Kontakt kommen. Die primäre Antikörpermischung setzt sich wie folgt zusammen:

- 7648 µl TBS/ 224 µl 3%iges Donkey Serum/ 64 µl 0,1 % Triton X
- 16 µl Monoclonal Rat anti-Bromodeoxyuridine-Antikörper (1:500)
- 32 µl Monoclonal Mouse anti-neuronal-Antikörper (1:250)

Die Inkubation erfolgt im Kühlraum bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag beginnt die Fortsetzung der Färbung mit einem 3 x 10-minütigen Waschdurchgang in TBS, der alle nicht gebundenen Antikörper entfernen soll.

Alle weiteren Arbeitsschritte müssen nun im Dunkeln ausgeführt werden, da die Immunfluoreszenz durch Lichteinwirkung an Leuchtkraft verliert. Mit einer sekundären Antikörpermischung wird für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundäre Antikörpermischung setzt sich wie folgt zusammen:

- 7652 µl TBS/ 228 µl 3%iges Donkey Serum/ 68 µl Triton X
- 16 µl Fluorescein (FITC)-conjugated Affini Pure Donkey Anti-Rat IgG (1:500)
- 16 µl Rhodamine Red-X-conjugated (ROX) Affini Pure Donkey Anti-Mouse IgG (1:500)

Danach werden 5 x 15 min lang die Schnitte gründlich mit TBS ausgewaschen, bevor sie auf Objektträger aufgezogen werden können. Aufgezogen werden mit Hilfe eines feinen Pinsel je zwei Gehirnschnitte aus einer mit 0,1 M PO₄-Puffer plus 1 Tropfen Triton X gefüllten Petrischale. Nach 10 min sind die Objektträger getrocknet und können mit Prolong-Antifade eingedeckt werden. Damit die Schnitte nicht austrocknen, umrandet man die Deckgläser mit

durchsichtigem Nagellack und beschriftet die Objektträger. Zur Lagerung werden fest verschließende und undurchsichtige Plastikobjektträgerkästen verwendet, um jegliches Eindringen von Licht zu vermeiden. Eine Lagerung bei 4 °C ist nicht zwingend erforderlich.

3.2.24.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur weiteren Differenzierung der positiv mit BrdU angefärbten Zellen erfolgt eine Beurteilung mit einem speziellen Digital Imaging ApoTome System der Firma Zeiss, bestehend aus folgenden Bestandteilen:

- Hochleistungsfluoreszenz Mikroskop (Axiovert 200)
- ApoTome (Gittereinschub)
- Kamera (AxioCam HR)
- Computer (XEON Hochleistungsrechner) und Software (AxioVision 4)

Das ApoTome erstellt durch seine Gitterstruktur präzise optische Schnittbilder durch das Präparat in einem bestimmten vorgegebenen Grenzbereich. In der vorliegenden Studie beträgt dieser Bereich 1 µm. Durch Einschieben des ApoTome in die Leuchtfeldblend-Ebene des Auflichtstrahlengangs des Mikroskops stellt sich die Gitterstruktur des ApoTome in der Objektebene scharf dar. Ein feinjustierter Scanningmechanismus versetzt nun die Gitterstruktur in der Präparatebene um den vorgegebenen Grenzbereich, dabei wird von jeder Gitterposition ein Bild aufgenommen. Der Computer berechnet aus den Einzelbildern ein Gesamtbild, welches auf einem Monitor wiedergegeben wird. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass nur eine definierte Ebene im Präparat dargestellt wird, eine Überstrahlung durch andere Ebenen wird verhindert. Im Verhältnis zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liefert das ApoTome System eine gute Bildqualität durch hohe optische Auflösung bei einem besserem Signal/Rausch-Verhältnis.

Ein Objektträger wird unter das Mikroskop gelegt und der Beginn des Gyrus dentatus wird in 400-facher Vergrößerung im Gesichtsfeld eingestellt. Der Immunfluoreszenzfilter Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird angeschaltet und der Gyrus dentatus langsam abgefahren. Jede Zelle, die BrdU in ihre DNS eingebaut hat, leuchtet nun grün auf. Hat man eine grüne Zelle gefunden, wird durch Umschalten auf den Rhodamine-Filter (CY 3) überprüft, ob dieselbe Zelle auch in rot fluoresziert. Am Monitor können die einzelnen Bilder der verschiedenen Fluoreszenzkanäle sowohl übereinander projiziert werden, als auch einzeln dargestellt werden. Dies erleichtert erheblich die Beurteilung der einzelnen Zellen auf eine Einfach- oder Doppel-Markierung (Erklärung s. unten). Insgesamt müssen die Schnitte jeder

Gehirnhälfte so lange durchmustert werden, bis je 50 doppelt markierte Zellen aufgefunden werden. Es wird eine Strichliste geführt, in der neben den 50 doppelt markierten Zellen auch die Anzahl der nur einfach markierten Zellen aufgeführt wird, und zusätzlich die Anzahl der benötigten Schnitte bis zum Erhalt der 50 Zellen vermerkt wird.

Beurteilung:

- doppelt markiert = gleichzeitig rot und grün fluoreszierend = NeuN-positiv und BrdU-positiv = neue Nervenzelle
- einfach markiert = nur grün fluoreszierend = nur BrdU-positiv = neue Zelle z.B. Gliazelle, keine neue Nervenzelle

3.2.24.2 Auswertung

Der prozentuale Anteil doppelt markierter Zellen von der Gesamtanzahl aller BrdU-positiven Zellen wird ermittelt, indem die Anzahl der einfach markierten Zellen ins Verhältnis zur Anzahl der doppelt markierten Zellen gesetzt wird. Die Berechnung erfolgt für die beiden Gehirnhälften getrennt. Für die verschiedenen Tiergruppen berechnet man sowohl die Mittelwerte (MW) als auch die Standardabweichungen (SD) der ermittelten Werte.

3.3 Laborbedarfsliste für die Färbungen

Antikörper der BrdU-Färbung:

1. Antikörper

- Anti-bromodeoxyuridine Cat. # 117037, mouse monoclonal IgG₁, 100 µg/ml, Fa. Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA

2. Antikörper

- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, Cat # 715- 065-151, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, Bezug über Dianova, Hamburg

Antikörper der Immunfluoreszenz-Färbung:

1. Antikörper

- OBT0030-Monoclonal Rat anti-bromodeoxyuridine, Cat # OBT0030, purified IgG_{2a}, 500 µg/ml, Oxford Biotechnology, Biotech House, UK
- Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody, Cat # MAB377, purified IgG₁, 1 mg/ml, Chemicon International, Temecula, CA, USA

2. Antikörper

- Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG, Cat # 712-095-153, 1,5 mg/ml
- Rhodamine (Red-X)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, Cat # 715-295-151, 1,3 mg/ml

Alle Antikörper von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, Bezug über Dianova, Hamburg

Chemikalien:

- Aqua Spüllösung, DeltaSelect, Pfullingen
- Borsäure zur Analyse, Merck, Darmstadt
- 3,3-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB), Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
- Donkey Serum, Pan Biotech GmbH, Aidenbach
- Eisessig 100 %, Merck, Darmstadt
- Ethanol 100 % pro analysis, Merck, Darmstadt
- Ethanol 96 %, Merck, Darmstadt
- Formamide, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Glycerol anhydrous, Fluka, Neu-Ulm
- farbloser Nagellack, Jade, Düsseldorf
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
- Natriumhypochloridlösung 12 % Cl, Roth, Karlsruhe
- Neo-Clear, Merck, Darmstadt
- Neo-Mount, Merck, Darmstadt
- Nickel(II)-Chlorid, Merck, Darmstadt
- Roti-Histokitt, Roth, Karlsruhe
- Roti-Histol, Roth, Karlsruhe
- Salzsäure 2 mol/l (2N), Merck, Darmstadt
- Saures Hämalun nach Mayer, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
- Natrium Phosphate dibasic heptahydrate, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Natrium Phosphate monobasic monohydrate, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
- Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- Trizma Base, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Trizma HCl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Vectashield Mounting-Medium, Vector, Burlingame, USA
- Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA
- Wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
- Wasserstoffperoxid 30 %, Merck, Darmstadt

Geräte:

- Inkubator Titramax 1000, Heidolph Instruments, Schwabach
- Schüttler Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau

Lösungen:

0,5 M Boratpuffer

15,45 g Borat

450 ml ddH₂O

5 ml 10 M NaOH

500 ml ddH₂O

mit 10 M NaOH auf pH 8,5 einstellen

50%ige Formamide-Lösung

5 ml Formamide

1 ml SSC (20x)

4 ml ddH₂O

Kryoprotektionslösung

250 ml Glycerin

250 ml Ethylenglycol

500 ml 0,1 M Phosphatpuffer

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1,0 M PO₄-Lösung

31,75 g NaH₂PO₄ x H₂O 100 ml

206,75 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O

1000 ml ddH₂O

SSC (20x)

175,3 g NaCl

88,2 g Na₂CO₃ x 2 H₂O

1000 ml ddH₂O

mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen

TBS (10x)

132,2 g Trisma HCl

19,4 g Trisma Base

90,0 g NaCl

855 ml ddH₂O

0,1 M PO₄-Lösung

1,0 M PO₄-Lösung

900 ml ddH₂O

SSC (2x)

100 ml SSC (20x)

900 ml ddH₂O

TBS (1x)

100 ml TBS (10x)

900 ml ddH₂O

10%ige Triton X-Lösung

20 ml Triton X-100

180 ml ddH₂O

0,6%ige Wasserstoffperoxid-Lösung

2 ml H₂O₂ 30 %

100 ml TBS (1x)

Verbrauchsmaterialien :

- Deckgläser 24 x 50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Einmal-Küvetten PS, Plastibrand, Fa. Brand, Wertheim
- Eppendorf-Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- Netwells, Costar, München
- Objektträger SuperFrost Plus, Menzel, Braunschweig
- TPP-Röhrchen (15 ml/50 ml), Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz
- Well Plastic Cell Culture Plates, Costar, München

3.4 Statistische Datenauswertung

Die statistischen Analysen erfolgen unter Anwendung der SPSS software (superior performing software system), Version 11.5.

Stetige Variablen werden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben.

Die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen hinsichtlich physiologischer Parameter überprüft man mit dem Kruskal-Wallis Test und im Falle von signifikantem Unterschied mit bivariatem Mann-Whitney-Test. Der Friedman Test und post hoc Wilcoxon Test werden angewandt, um innerhalb der Gruppen zeitliche Unterschiede in den physiologischen Parametern während des Experiments getrennt für jede Gruppe aufzuzeigen.

Primäre Studienendpunkte wie BrdU, eosinophile Zellen, Neuronen und das Volumen des Hippokampus analysiert man getrennt für jede Hemisphäre. Für die Auswertung wird der Kruskal-Wallis Test und post hoc Mann-Whitney-Tests durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Eine Bonferroni Korrektur erfolgt für die gesamte Auswertung zur Adjustierung multipler Tests.

Den Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet man, um Zusammenhänge zwischen einem HE-Schaden und der Anzahl von neu gebildeten Neuronen festzustellen. Tiere mit positivem HE-Schaden werden mit Tieren mit nicht nachweisbarem HE-Schaden hinsichtlich der Zahl der Neuronen mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Alle Tests werden zweiseitig zu einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt.

3.5 Ergebnisse

Insgesamt gehen 56 Tiere, die randomisiert in sieben Gruppen eingeteilt werden, in die hier vorliegende Studie ein. Davon durchlaufen 48 Tiere den operativen Teil des Versuchs.

In den nachfolgenden Kapiteln finden sich die bereits in Kapitel 3.2.3 eingeführten Gruppeneinteilungen wieder, die an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit noch mal dargestellt werden.

<u>Ischämie (BCAO)</u>	<u>Scheinversuch (SV)</u>
Gruppe 1: Sevofluran 1,4 Vol% BCAO über 10 min = Sevo 1,4 Vol% BCAO	Gruppe 4: Sevofluran 1,4 Vol% keine BCAO = Sevo 1,4 Vol% SV
Gruppe 2: Sevofluran 2,8 Vol% BCAO über 10 min = Sevo 2,8 Vol% BCAO	Gruppe 5: Sevofluran 2,8 Vol% keine BCAO = Sevo 2,8 Vol% SV
Gruppe 3: Halothan 0,8 Vol% BCAO über 10 min = Hal 0,8 Vol% BCAO	Gruppe 6: Halothan 0,8 Vol% keine BCAO = Hal 0,8 Vol% SV

Abb. 12. Gruppeneinteilung.

*Gruppeneinteilung der Tiere, die in den operativen Teil eingehen (n = 8 pro Gruppe).
BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis*

Die acht restlichen Tiere bilden die Nativtier-Gruppe (Gruppe 7), diese Gruppe durchläuft den operativen Teil des Versuches nicht. Sie liefern die physiologischen und pathologisch-anatomischen Referenzwerte für die histologischen Ergebnisse der Arbeit.

3.5.1 Physiologische Parameter während des operativen Teils des Versuchs

Die im folgenden Kapitel dargestellten Ergebnisse setzen sich aus den während der operativen Phase gewonnenen Daten der Gruppen 1 bis 6 zusammen. Alle sechs Gruppen werden in Bezug auf die Ergebnisse der vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkte miteinander verglichen. Die BCAO-Gruppen werden jeweils mit den Scheinversuchs-Gruppen der gleichen Anästhesieform verglichen, des Weiteren werden alle Scheinversuchs-Gruppen untereinander verglichen sowie auch alle BCAO-Gruppen untereinander.

Körpergewicht

Die Tiere werden nach ihrer randomisierten Zuteilung zu einer der sechs verschiedenen Gruppen vor Einleitung der Narkose gewogen. Der Mittelwert und die Standardabweichung des Körpergewichts der Tiere betragen 370 ± 10 g.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF) und Hämoglobin (Hb)

In der folgenden Tabelle (Tab.03) sind, ebenfalls aufgeteilt nach den sechs Untersuchungsgruppen, die Mittelwerte und die Standardabweichungen vom mittleren arteriellen Blutdruck (mmHg), Herzfrequenz (Schläge/min) und Hämoglobin (mg/dl) zu den vier verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 03. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz und Hämoglobingehalt

		Sevo 1,4 Vol%		Sevo 2,8 Vol%		Hal 0,8 Vol%	
	Messzeitpunkt	BCAO	SV	BCAO	SV	BCAO	SV
MAP (mmHg)	AW	107 ± 4	101 ± 11	108 ± 7	103 ± 8	105 ± 6	105 ± 6
	Isch	40 ± 1,2 k	93 ± 16	40 ± 0,5 k	86 ± 18	41 ± 0,5 k	86 ± 7
	Rep	116 ± 7	104 ± 8	108 ± 8	107 ± 10	110 ± 7	101 ± 11
	Erh	110 ± 9	104 ± 7	106 ± 5	103 ± 4	106 ± 9	100 ± 9
Herz- frequenz (Schläge/min)	AW	349 ± 57	344 ± 53	359 ± 40	353 ± 38	353 ± 68	324 ± 27
	Isch	365 ± 49	350 ± 50	371 ± 46	343 ± 38	353 ± 60	343 ± 39
	Rep	349 ± 42	355 ± 66	358 ± 36	345 ± 42	360 ± 46	333 ± 44
	Erh	355 ± 50	378 ± 67	366 ± 31	348 ± 40	368 ± 57	338 ± 54
Hämo- globin (mg/dl)	AW	12,5 ± 0,7	12,3 ± 1,2	12,3 ± 1,3	12,4 ± 1,0	12,4 ± 1,2	12,9 ± 0,8
	Isch	10,8 ± 1,3	11,60 ± 1,3	10,8 ± 1,1	11,7 ± 1,0	10,2 ± 1,0 *	12,7 ± 0,8
	Rep	12,0 ± 0,9	12,5 ± 1,3	11,8 ± 0,9	11,5 ± 0,9	12,2 ± 1,4	12,5 ± 0,9
	Erh	13,1 ± 1,3 #	12,0 ± 1,1	12,0 ± 1,0 #	11,4 ± 0,8	12,2 ± 1,1	12,4 ± 1,2

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (±SD) des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg), der Herzfrequenz (Schläge/min) und der Hämoglobinkonzentration (mg/dl) der sechs Versuchs-Gruppen (n=8) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

*Signifikanzen: k = kontrollierter Parameter; * = p<0,05 vs. Scheinversuch(SV) in derselben Narkoseform zum gleichen Messzeitpunkt; # = p<0,05 vs. Isch in derselben Gruppe*

*AW = Ausgangwert; Isch = Ischämie; Rep = Reperfusion; Erh = Erholung;
BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis*

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) ist während der ischämischen Phase in allen drei BCAO-Gruppen im Vergleich zur den drei SV-Gruppen versuchsbedingt signifikant erniedrigt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Beim Betrachten der Herzfrequenz können keine signifikanten Unterschiede zwischen den sechs verschiedenen Gruppen aufgezeigt werden. Es lassen sich tendenziell höhere Werte in den Sevo BCAO-Gruppen während der Ischämiephase im Vergleich zu allen drei SV-Gruppen feststellen.

Das Gesamthämoglobin zeigt in allen Sevo BCAO-Gruppen in der Erholungsphase einen signifikant höheren Wert als in der Ischämiephase.

Während sich in der Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe im Vergleich zur Hal 0,8 Vol% SV-Gruppe ein signifikant erniedrigter Hämoglobinwert während des Blutentzugs zeigt, unterscheiden sich die Sevo BCAO-Gruppen in dieser Phase nur tendenziell von den Sevo SV-Gruppen.

Blutgasanalyse

Es werden arterielle Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (PaO_2), des Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO_2) und des pH-Wertes sowie der Atemfrequenz während des Versuchs zu den vier festgelegten Messzeitpunkten durchgeführt, deren Werte in der folgenden Tabelle (Tab.04) aufgeführt sind.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 04. Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂), pH-Wert und Atemfrequenz

		Sevo 1,4 Vol%		Sevo 2,8 Vol%		Hal 0,8 Vol%	
	Messzeitpunkt	BCAO	SV	BCAO	SV	BCAO	SV
PaO₂ (mmHg)	AW	128 ± 24 #§	142 ± 15	107 ± 23	111 ± 16	120 ± 23	123 ± 26
	Isch	170 ± 32	157 ± 21	141 ± 20 \$	117 ± 14	167 ± 18	131 ± 22
	Rep	169 ± 26	159 ± 24	132 ± 23	117 ± 12	158 ± 32	132 ± 26
	Erh	146 ± 25	160 ± 24	120 ± 23	120 ± 10	154 ± 22	147 ± 44
PaCO₂ (mmHg)	AW	39 ± 4	39 ± 4	44 ± 3	43 ± 4	41 ±	40 ± 4
	Isch	32 ± 7	37 ± 5	33 ± 3 *	40 ± 4	30 ± 3 *	40 ± 3
	Rep	37 ± 4	37 ± 4	42 ± 4 #	40 ± 5	40 ± 5	38 ± 4
	Erh	35 ± 3	35 ± 4	41 ± 3 #	40 ± 4	39 ± 2	38 ± 4
pH-Wert	AW	7,40 ± 0,02	7,38 ± 0,05	7,35 ± 0,02	7,34 ± 0,04	7,35 ± 0,03	7,39 ± 0,03
	Isch	7,44 ± 0,06	7,42 ± 0,05	7,41 ± 0,06	7,36 ± 0,03	7,43 ± 0,04	7,39 ± 0,02
	Rep	7,42 ± 0,02	7,42 ± 0,03	7,38 ± 0,04 \$	7,36 ± 0,03 Δ	7,39 ± 0,04	7,39 ± 0,03
	Erh	7,43 ± 0,04	7,40 ± 0,04	7,39 ± 0,04	7,36 ± 0,03	7,39 ± 0,03	7,40 ± 0,03
Atemfrequenz (/min)	AW	60 ± 5	58 ± 7	61 ± 4 #	60 ± 1	59 ± 4	56 ± 6
	Isch	47 ± 8	58 ± 8	52 ± 5	63 ± 10	46 ± 4 *	58 ± 6
	Rep	56 ± 10	56 ± 4	60 ± 5	65 ± 1	53 ± 3	62 ± 8
	Erh	55 ± 8	58 ± 7	62 ± 6	66 ± 8	55 ± 7	62 ± 7

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (\pm SD) des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg), des Kohlendioxidpartialdrucks (mmHg), des pH-Wertes und der Atemfrequenz (/min) der sechs Untersuchungsgruppen (n=8) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch(SV) in derselben Narkoseform zum gleichen Messzeitpunkt; # = $p < 0,05$ vs. Isch in derselben Gruppe; \$ = $p < 0,05$ vs. Sevo 1,4 Vol% BCAO zum gleichen Messzeitpunkt; Δ = $p < 0,05$ vs. Sevo 1,4 Vol% SV zum gleichen Messzeitpunkt; § = $p < 0,05$ vs. Rep in der gleichen Gruppe
 AW = Ausgangswert; Isch = Ischämie; Rep = Reperfusion; Erh = Erholung;
 BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

Der Sauerstoffpartialdruck weist im zeitlichen Verlauf in der Sevo 1,4 Vol% BCAO-Gruppe einen signifikant niedrigeren Ausgangswert gegenüber dem folgenden Ischämie- und Reperfusionswert auf.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Im Gruppenvergleich zeigt der ermittelte Wert des Sauerstoffpartialdrucks in der Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe während der Ischämiephase einen signifikant niedrigeren Wert zur Sevo 1,4 Vol% BCAO-Gruppe.

Der Kohlendioxidpartialdruck zeigt im Vergleich der verschiedenen Messzeitpunkte in der Sevo 2,8Vol% BCAO-Gruppe eine signifikante Erhöhung in allen drei Messzeitpunkten (Ausgangswert, Reperfusion und Erholung) gegenüber dem Ischämiezeitpunkt.

Im Gruppenvergleich weisen sowohl die Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe als auch die Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe gegenüber ihren SV-Gruppen einen signifikant niedrigeren Kohlendioxidpartialdruck in der Ischämiephase auf.

Innerhalb einer Gruppe zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten gibt es keine signifikanten pH-Wert Unterschiede. Es zeigt sich lediglich im Gruppenvergleich eine signifikante Erniedrigung zum Zeitpunkt der Reperfusion in den beiden Sevo 2,8 Vol% (BCAO und SV) Gruppen gegenüber den Sevo 1,4 Vol% Gruppen (BCAO und SV).

Vergleicht man in der Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe den Ausgangswert der Atemfrequenz mit dem Wert während der Ischämiephase, stellt sich dieser signifikant höher dar. Im Gruppen-Vergleich zeigt die Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe während der Ischämiephase einen signifikant niedrigeren Wert gegenüber der Hal 0,8 Vol% SV-Gruppe.

Blutglukosekonzentration (Glukose)

In der folgenden Tabelle (Tab.05) findet sich, aufgeteilt nach den sechs Versuchs-Gruppen, eine Darstellung der Blutglukosekonzentration zu den vier verschiedenen Messzeitpunkten.

Tab. 05. Blutglukosekonzentration (Glukose)

	Messzeit- punkt	Sevo 1,4 Vol%		Sevo 2,8 Vol%		Hal0,8 Vol%	
		BCAO	SV	BCAO	SV	BCAO	SV

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Glukose (mg/dl)	AW	81 ± 21	75 ± 13	95 ± 32	72 ± 8	84 ± 26 #	75 ± 14
	Isch	83 ± 22	67 ± 8	106 ± 39 *Δ	80 ± 11	108 ± 38 *Δ	70 ± 10
	Rep	82 ± 18	69 ± 8	94 ± 26 Δ	83 ± 11 Δ	93 ± 27	70 ± 12
	Erh	80 ± 14	70 ± 15	92 ± 22	75 ± 16	82 ± 16	68 ± 11

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen ($\pm SD$) der Blutglukosekonzentration (mg/dl) der sechs Versuchs-Gruppen ($n=8$ bzw. Sevo 2,8 Vol% $n=7$) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

*Signifikanzen: * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch(SV) in derselben Narkoseform zum gleichen Messzeitpunkt; # = $p < 0,05$ vs. Isch in derselben Gruppe; Δ = $p < 0,05$ vs. Sevo 1,4 Vol% SV zum gleichen Messzeitpunkt*

*AW = Ausgangswert; Isch = Ischämie; Rep = Reperfusion; Erh = Erholung;
BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis; SV = Scheinversuch*

Da allen Tieren 12 Stunden vor Versuchsbeginn die Nahrung entzogen wurde, liegt in allen sechs Gruppen die Blutglukosekonzentration in einem zu erwartenden niedrigen physiologischen Bereich. Allerdings zeigt ein Tier in der Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe konstant zu hohe Werte, so dass in dieser Gruppe nur sieben Tiere in die Statistik eingehen und das betreffende Tier somit rausfällt.

In der Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe zeigt sich sowohl in der Ischämie- als auch in der Reperfusionsphase gegenüber der dazugehörigen SV-Gruppe und der Sevo 1,4 Vol% SV-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Glukosewerte. In der Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe kommt es in der Ischämiephase zu einem signifikanten Anstieg der Glukose gegenüber dem Ausgangswert. Dieser Wert ist auch signifikant gegenüber der eigenen SV-Gruppe und der Sevo 1,4 Vol% SV-Gruppe.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Perikranielle Temperatur (T peri)

In der folgenden Tabelle (Tab.06) findet sich, aufgeteilt nach den sechs Versuchs-Gruppen, eine Darstellung der perikraniellen Temperatur zu den vier verschiedenen Messzeitpunkten.

Tab. 06. Perikranielle Temperatur (T peri)

		Sevo 1,4 Vol%		Sevo 2,8 Vol%		Hal 0,8 Vol%	
	Messzeitpunkt	BCAO	SV	BCAO	SV	BCAO	SV
T peri (°C)	AW	37,9 ± 0,3	37,6 ± 0,2	37,7 ± 0,2	37,9 ± 0,4	37,6 ± 0,2	37,7 ± 0,2
	Isch	37,3 ± 0,3	37,6 ± 0,2	37,2 ± 0,3 k*	37,8 ± 0,5	37,2 ± 0,2 k*	37,7 ± 0,2
	Rep	37,6 ± 0,2	37,7 ± 0,3	37,5 ± 0,3	37,9 ± 0,4	37,5 ± 0,6	37,7 ± 0,2
	Erh	37,8 ± 0,3	37,8 ± 0,3	37,7 ± 0,2	37,7 ± 0,5	37,6 ± 0,1	37,7 ± 0,2

Darstellung von Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (±SD) der perikraniellen Temperatur (°C) der sechs Versuchs-Gruppen (n=8) zu den vier festgelegten intraoperativen Messzeitpunkten.

*Signifikanzen: k = kontrollierter Parameter; * = p<0,05 vs. Scheinversuch (SV) in derselben Narkoseform zum gleichen Messzeitpunkt*

*AW = Ausgangwert; Isch = Ischämie; Rep = Reperfusion; Erh = Erholung;
BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis*

Die Messung der perikraniellen Temperatur erfolgt fortlaufend, wobei zu den vier festgelegten Messzeitpunkten die jeweiligen Werte schriftlich festgehalten werden. Abweichungen unter 37,2 °C und über 37,9 °C werden durch Ein- oder Ausschalten der Wärmelampe reguliert, angestrebt wird ein physiologischer Wert von 37,5 °C.

In der Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe zeigt sich während der Ischämiephase eine versuchsbedingte, signifikante Erniedrigung der perikraniellen Temperatur im Vergleich zur Hal 0,8 Vol% SV-Gruppe.

3.5.2 Histologische Untersuchung der Gehirne

Eine Anfärbung der Gehirnschnitte erfolgt mit der HE-Färbung zur Ermittlung des neuronalen Zellschadens im Hippokampus sowie zur Messung des Volumens des Gyrus dentatus. Zur quantitativen Erfassung aller neu gebildeten Zellen wird eine immunhistochemische BrdU-Färbung durchgeführt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wird der Anteil an Neuronen bestimmt. Zusätzlich zu den operierten Tieren (Gruppe 1-6) kommen nun im histologischen Ergebnisteil die Gruppe der Nativtiere (Gruppe 7) dazu. Diese Tiere werden wie alle anderen Tiere zur In-vivo-Markierung 7 Tage lang mit BrdU gespritzt, sie werden aber keinem operativen Eingriff unterzogen. Sie liefern die physiologischen Vergleichswerte der spontanen adulten Neurogenese im Gyrus dentatus.

3.5.2.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung dient zur Quantifizierung des histopathologischen Schadens unter der Verwendung eines Lichtmikroskops. Die Beurteilung des induzierten Schadens erfolgt dabei getrennt für die CA1-Region und die CA3-Region. Da sich nach statistischer Überprüfung keine Signifikanzen im Vergleich der linken und rechten Hemisphäre ergeben, werden die Ergebnisse beider Hemisphären zusammengefasst. Um einen Überblick über das Schadensausmaß zu erhalten, wird eine Schadensklassifizierung (s. Kap. 3.2.21.1) nach SANO (1992) und MIURA (1998) durchgeführt und der HE-Index errechnet.

Tab. 07. Ermittlung des Zellschadens in der CA1-Region

Gruppe	Behandlung	HE-Index CA1
Sevo	BCAO	0,6 ± 0,84 * #
1,4 Vol%	SV	0,0 ± 0,0
Sevo	BCAO	1,07 ± 1,14 * #
2,8 Vol%	SV	0,0 ± 0,0
Hal	BCAO	1,18 ± 1,21 * #
0,8 Vol%	SV	0,0 ± 0,0
Nativ-Gruppe	∅	0,0 ± 0,0

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) des neuronalen Zellschadens (HE-Index) in der CA1-Region des Hippokampus nach 28 Tagen Überlebenszeit der sieben Versuchsgruppen (n=8).

*Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = p<0,05 vs. Scheinversuch (SV); # = p<0,05 vs. Nativ-Gruppe*

∅ = keine Behandlung

SV = Scheinversuch

BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

Alle SV-Gruppen und die Nativ-Gruppe weisen keinerlei Schaden in der CA1-Region auf. Im Vergleich dazu ist bei den BCAA Tieren aller Narkose-Gruppen ein signifikanter Schaden zu erkennen gegenüber den jeweiligen dazugehörigen SV-Gruppen und der Nativgruppe. Vergleicht man wiederum die BCAA-Gruppen miteinander, ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 13).

Neuronaler Schaden
in der CA1-Region

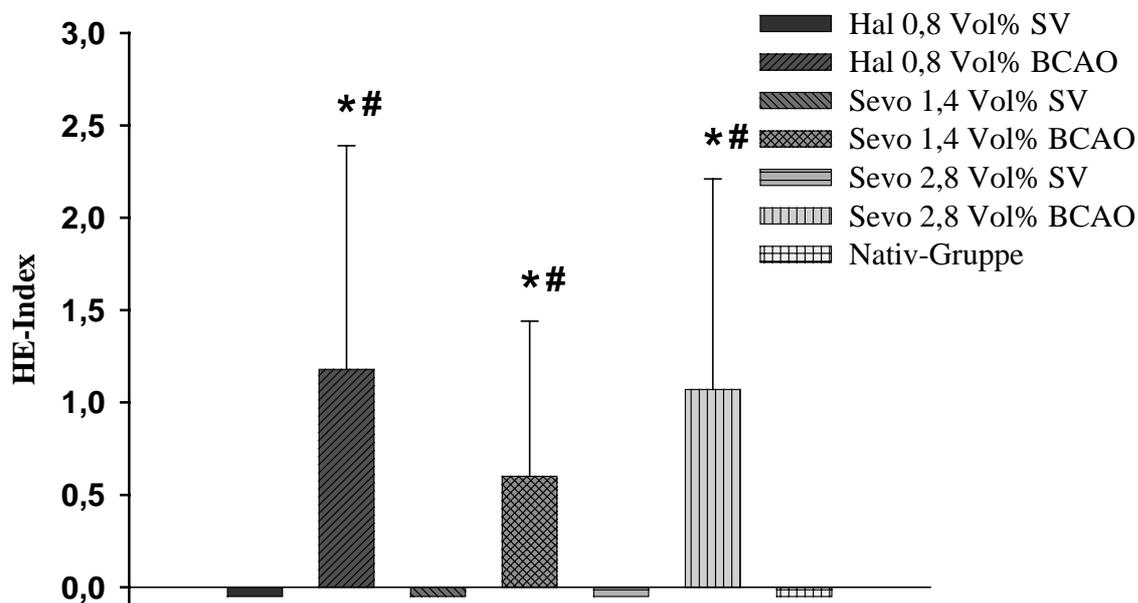


Abb. 13. Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des neuronalen Zellschaden (HE-Index) in der CA1-Region des Hippokampus nach 28 Tagen Überlebenszeit der sieben Versuchsgruppen (n=8).

Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch (SV); # = $p < 0,05$ vs. Nativ-Gruppe

Hal = Halothan; Sevo = Sevofluran; BCAA = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis; SV = Scheinversuch

Tab. 08. Ermittlung des Zellschadens in der CA3-Region

Gruppe	Behandlung	HE-Index CA3
Sevo 1,4 Vol%	BCAO	0,01 ± 0,02
	SV	0,0 ± 0,0
Sevo 2,8 Vol%	BCAO	0,05 ± 0,01
	SV	0,0 ± 0,0
Hal 0,8 Vol%	BCAO	0,02 ± 0,04
	SV	0,0 ± 0,0
Nativ-Gruppe	∅	0,0 ± 0,0

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des neuronalen Zellschaden (HE-Index) in der CA3-Region des Hippokampus nach 28 Tagen Überlebenszeit der sieben Versuchsgruppen (n=8).

Signifikanzen: keine

∅ = keine Behandlung

SV = Scheinversuch

BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

In der CA3-Region zeigt sich wie in auch in der CA1-Region für alle SV-Gruppen und die Nativ-Gruppe kein sichtbarer Schaden. In allen drei BCAO-Gruppen zeigt sich tendenziell eine geringgradige Schädigung gegenüber den jeweiligen dazugehörigen SV-Gruppen und der Nativgruppe.

Die folgenden zwei Abbildungen (Abbildung 14 und 15) zeigen Fotos der unterschiedlichen Schadensklassen der CA1- und CA3-Region des Hippokampus in der HE-Färbung.

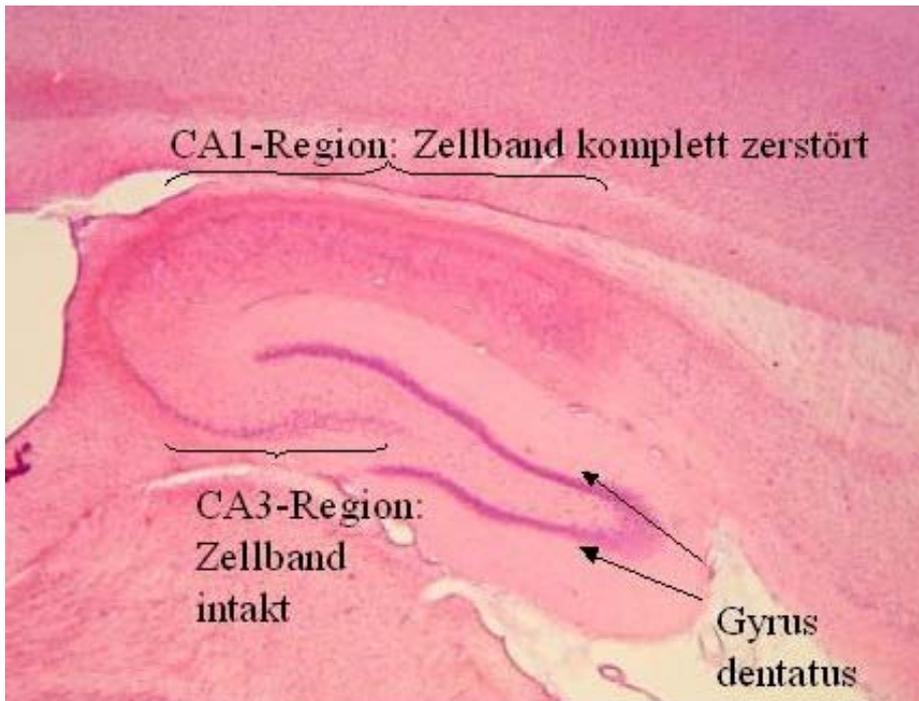


Abb. 14. Sevofluran 1,4 Vol% BCAO-Gruppe.

Repräsentative Darstellung für einen sichtbaren histologischen Schaden (Schadensklasse 3, Zellband komplett zerstört) in der CA1-Region des Hippokampus 28 Tage nach incompletter zerebraler Ischämie. Die CA3-Region ist ohne Schaden (Zellband intakt). (Vergr.: 25x)

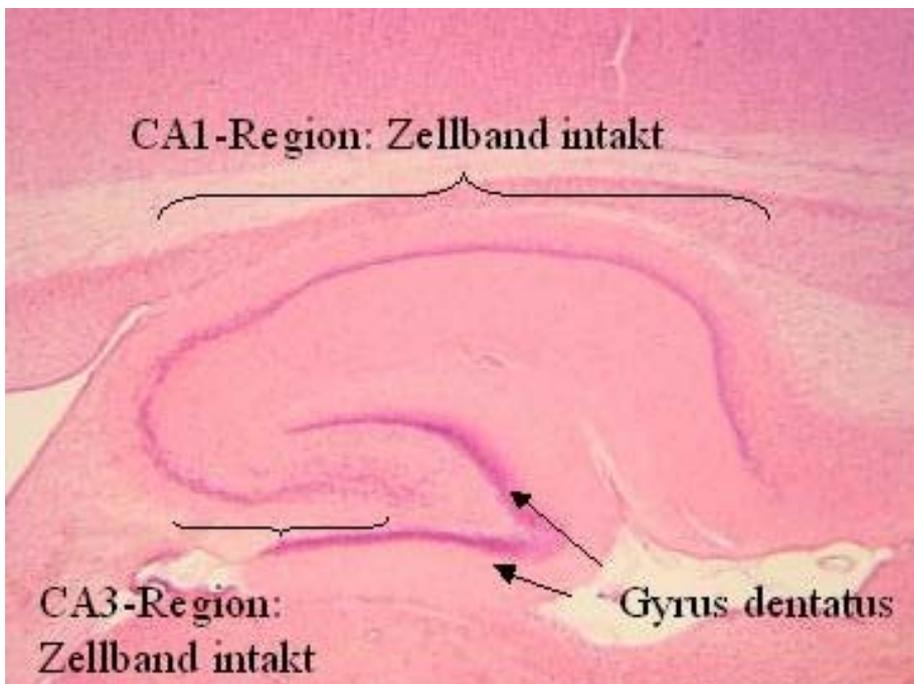


Abb. 15. Nativ-Gruppe.

Repräsentative Darstellung für ein intaktes histologisches Bild (Schadensklasse 0, Zellband intakt) in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus in den Scheinversuch-Gruppen und in der Nativ-Gruppe. (Vergr.: 25x)

3.5.2.2 Volumenbestimmung

Mit Hilfe der HE-Färbung erfolgt die computergestützte Flächenbestimmung des Gyrus dentatus. Die Ermittlung der Gesamtfläche ergibt sich aus den für jede Hemisphäre einzeln bestimmten Werten (Tab.09). Das Gesamtvolumen kann mit Hilfe der bestimmten Fläche errechnet werden (s. Kapitel 3.2.22.1).

Tab. 09. Volumen des Gyrus dentatus

Gruppe	Behandlung	Volumen (mm³)
Sevo 1,4 Vol%	BCAO	1,955 ± 0,234
	SV	1,988 ± 0,193
Sevo 2,8 Vol%	BCAO	2,057 ± 0,309
	SV	1,980 ± 0,276
Hal 0,8 Vol%	BCAO	2,079 ± 0,143
	SV	2,107 ± 0,218
Nativ-Gruppe	∅	1,913 ± 0,223

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des Volumens (mm³) des Gyrus dentatus der sieben Versuchs-Gruppen (n=8) nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.

Signifikanzen: keine

∅ = keine Behandlung

SV = Scheinversuch

BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

Die Mittelwerte des Volumens des Gyrus dentatus aller untersuchten sieben Versuchstier-Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede.

3.5.2.3 Zellproliferation im Gyrus dentatus

Zur Detektion neu gebildeter Zellen nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie im Gyrus dentatus der adulten Ratte werden allen 56 Tieren an sieben aufeinanderfolgenden Tagen BrdU (100 mg/kg) einmal täglich intraperitoneal gespritzt. Die Injektion erfolgt immer zum gleichen Zeitpunkt. Nach einem Überlebenszeitraum von 28 Tagen werden die Tiere mit PFA perfundiert. Die auf diese Weise fixierten Gehirne werden am Schlittenmikrotom sagittal in Serie geschnitten, die Schnittdicke beträgt genau 40 µm. Davon wird jeder zehnte Schnitt zur BrdU-Färbung herangezogen. Die direkte Auszählung der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen erfolgt am Lichtmikroskop getrennt nach rechter und linker Hemisphäre. Da sich nach statistischer Überprüfung kein statistischer Unterschied für rechts und links ergibt, werden die Ergebnisse zusammengefasst. Um die absolute Zellzahl des gesamten Gehirns zu erhalten, muss die Anzahl der ermittelten Zellen noch mit 10 multipliziert werden (entspricht der Anzahl der Eppendorfgefäße). In der folgenden Tabelle (Tab.10) sind die ermittelten Gesamtzahlen dargestellt.

Tab. 10. Gesamtanzahl der vorhandenen BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus nach 28 Tagen

Gruppe	Behandlung	Gesamtanzahl BrdU-Zellen
Sevo 1,4 Vol%	BCAO	276 ± 255
	SV	136 ± 89
Sevo 2,8 Vol%	BCAO	474 ± 374 * #
	SV	174 ± 123
Hal 0,8 Vol%	BCAO	432 ± 221 * #
	SV	113 ± 86
Nativ-Gruppe	∅	210 ± 90

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (±SD) der Gesamtanzahl an BrdU-positiven Zellen der sieben Untersuchungsgruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.

*Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = p<0,05 vs. Scheinversuch (SV); # = p<0,05 vs. Nativ-Gruppe*

∅ = keine Behandlung

SV = Scheinversuch

BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

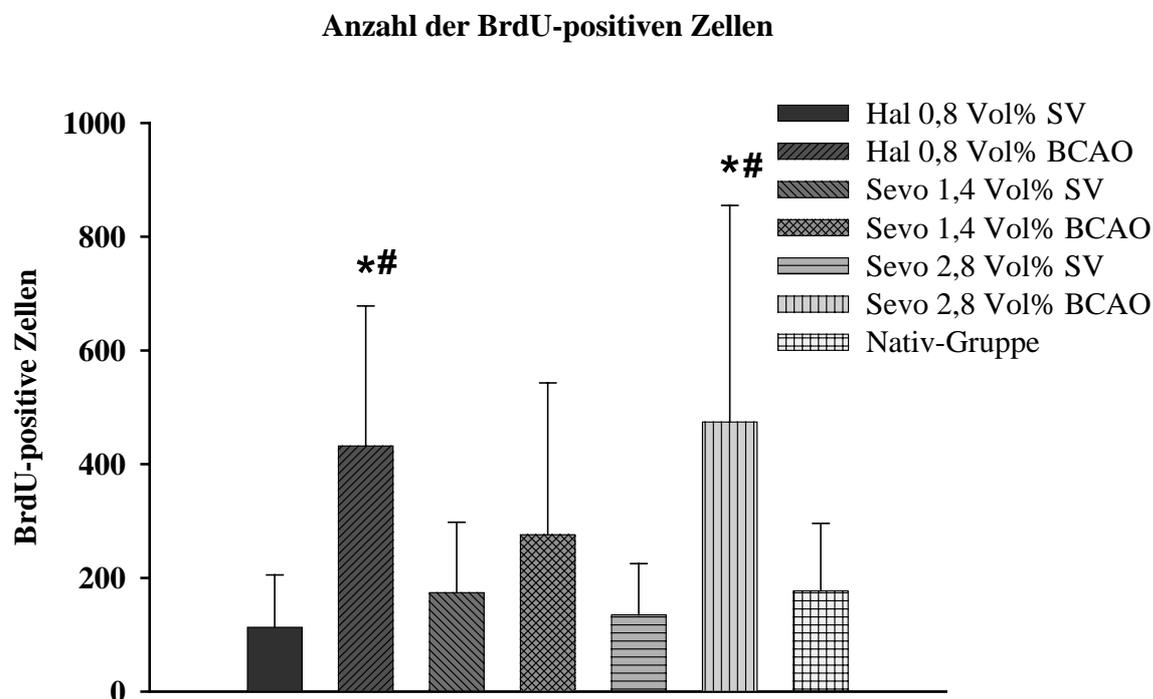


Abb. 16. Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Gesamtzahl an BrdU-positiven Zellen in den sieben Versuch-Gruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.

Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch (SV); # = $p < 0,05$ vs. Nativ-Gruppe

Hal = Halothan; Sevo = Sevofluran; Isch = Ischämie ; SV = Scheinversuch

Die quantitative Analyse der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus zeigt innerhalb der SV-Gruppen und der Nativ-Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Eine signifikante Erhöhung der Zellzahl zeigen die BCAO-Gruppen Hal

0,8 Vol % und Sevo 2,8 Vol% gegenüber ihren jeweiligen SV-Gruppen und der Nativ-Gruppe. Für die Sevo 1,4 Vol% BCAO-Gruppe ergibt sich lediglich eine tendenzielle Erhöhung gegenüber der Sevo 1,4 Vol% SV-Gruppe und der Nativ-Gruppe.

Die folgenden zwei Abbildungen (Abbildung 17 und 18) zeigen zwei Fotos von BrdU-positiven neu gebildeten Zellen in der BrdU-Färbung.

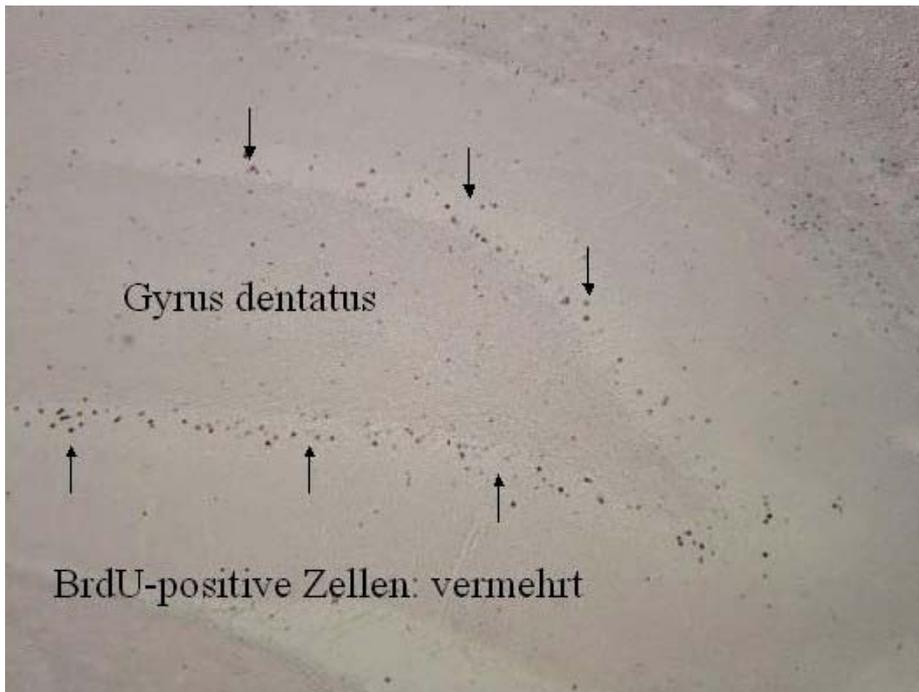


Abb. 17. Sevofluran 2,8 Vol% BCAO-Gruppe.

Repräsentative Darstellung der deutlich gesteigerten Proliferation BrdU-positiver Zellen im Gyrus dentatus der Ratte 28 Tage nach inkompletter zerebraler Ischämie. (Vergr.: 60x)

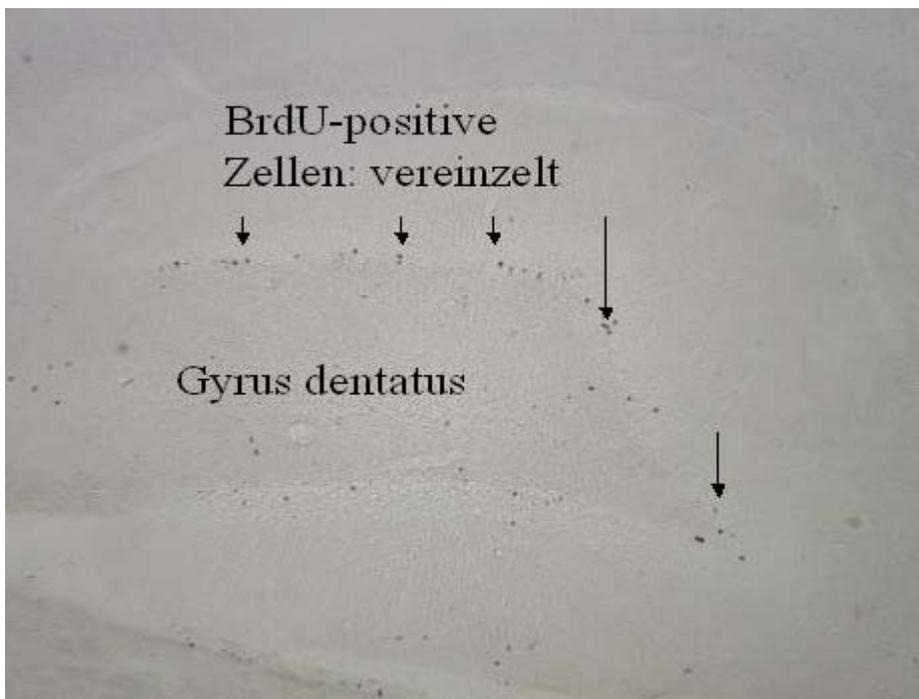


Abb. 18. Nativ-Gruppe.

Repräsentative Darstellung der physiologischen Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus der Ratte in den Scheinversuch-Gruppen und in der Nativ-Gruppe. (Vergr.: 60x)

3.5.2.4 Anteil der neu gebildeten Neuronen im Gyrus dentatus nach einer inkompletten zerebralen Ischämie

Nach einer Überlebenszeit von 28 Tagen erfolgt die histologische Untersuchung der PFA-fixierten Gehirne. Zur Anfärbung der neu gebildeten Zellen wird ein primärer Antikörper gegen BrdU gleichzeitig mit einem primären NeuN Antikörper eingesetzt. Diese primären Antikörper werden durch fluoreszierende sekundäre Antikörper markiert. Die Sichtbarmachung des Fluoreszenzsignals der Antikörper erfolgt am konfokalen Lasermikroskop (ApoTom). Alle BrdU-haltigen Zellen fluoreszieren grün, Nervenzellen zusätzlich rot. Ein Vorhandensein beider Marker in einer Zelle kann durch das Übereinanderlegen der in den jeweiligen Wellenlängen erzeugten Einzelbilder dargestellt werden. In jeder Hemisphäre werden im Gyrus dentatus 50 BrdU-positive Zellen (pro Gehirn also 100 Zellen) zufällig ausgesucht und nach einer gleichzeitig vorhandenen Markierung mit NeuN untersucht. Der so ermittelte Prozentsatz wird mit der in der BrdU-Färbung ermittelten Anzahl BrdU-positiver Zellen hochgerechnet, um die Gesamtanzahl an neu gebildeten Nervenzellen im Gyrus dentatus darzustellen. Da sich nach statistischer Überprüfung der beiden Hemisphären keine signifikanten Seitenunterschiede ergeben, werden die Ergebnisse zusammengefasst (Tab.11).

Tab. 11. Gesamtanzahl der neu gebildeten Neuronen im Gyrus dentatus nach 28 Tagen

Gruppe	Behandlung	Gesamtanzahl neuer Neuronen
Sevo 1,4 Vol%	BCAO	250 ± 235
	SV	155 ± 106
Sevo 2,8 Vol%	BCAO	376 ± 312 * #
	SV	124 ± 82
Hal 0,8 Vol%	BCAO	360 ± 202 * #
	SV	105 ± 80
Nativ-Gruppe	∅	159 ± 91

Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (±SD) der Gesamtanzahl der doppelt markierten Zellen (neue Neuronen) der sieben Untersuchungsgruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.

*Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch (SV); # = $p < 0,05$ vs. Nativ-Gruppe*

∅ = keine Behandlung

SV = Scheinversuch

BCAO = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis

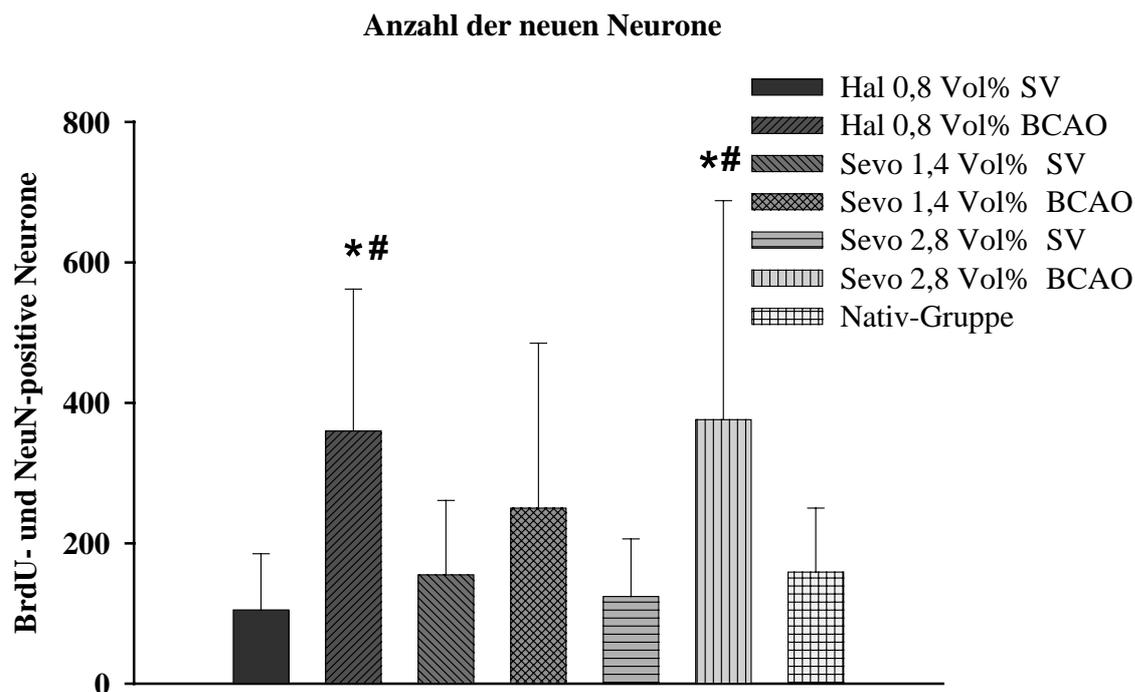


Abb. 19. Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Gesamtzahl an doppelt markierten Zellen (BrdU- und NeuN-positiver Neuronen) in den sieben Versuchs-Gruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.

*Signifikanzen: ohne Zeichen = keine Signifikanz; * = $p < 0,05$ vs. Scheinversuch (SV); # = $p < 0,05$ vs. Nativ-Gruppe*

Hal = Halothan; Sevo = Sevofluran; BCAA = beidseitige Okklusion der Arteria carotis communis ; SV = Scheinversuch

Innerhalb der verschiedenen SV-Gruppen und der Nativ-Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der neu gebildeten Neuronen.

In den BCAA-Gruppen ist im Vergleich zu den dazugehörigen SV-Gruppen und der Nativ-Gruppe der Anteil der neu gebildeten Neuronen signifikant erhöht bzw. in der Sevo 1,4 Vol% BCAA-Gruppe tendenziell erhöht. Innerhalb der BCAA-Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Der prozentuale Anteil neuronaler Ausdifferenzierung neu gebildeter Zellen im Gyrus dentatus liegt in allen Versuchs-Gruppen bei ca. 90 %. Es wird eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß des Nervenzellschadens und der Anzahl neu gebildeter Nervenzellen festgestellt.

Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 20 und 21) zeigen zwei Fotos von BrdU-positiven neu gebildeten Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung.

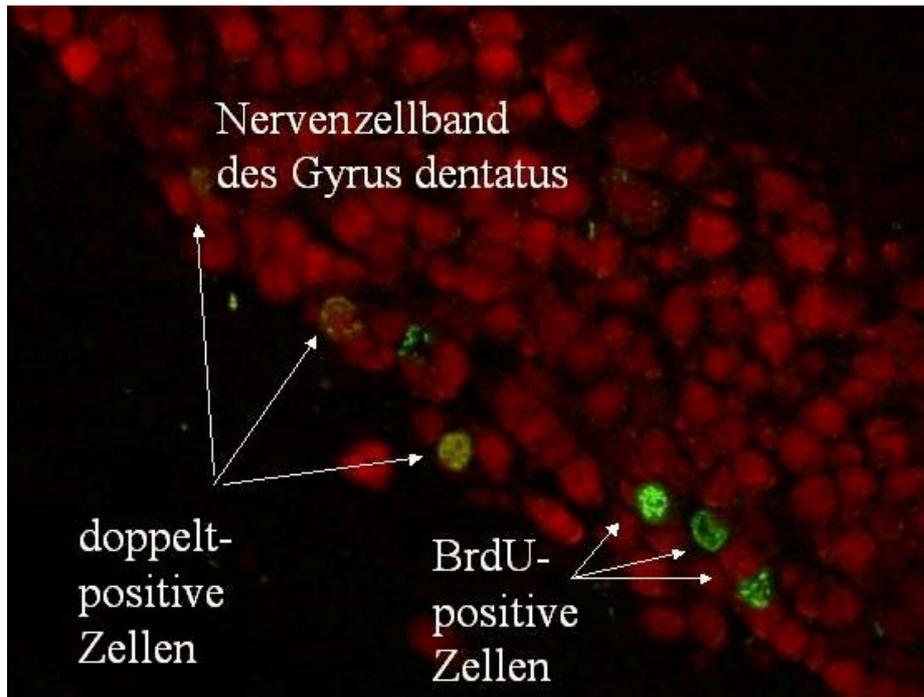


Abb. 20. Sevofluran 2,8 Vol% BCAO-Gruppe.

Repräsentative Fluoreszenzdarstellung neu gebildeter Nervenzellen im Gyrus dentatus nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen nach inkompletter zerebraler Ischämie. Rot dargestellt sind mit NeuN markierte Zellen (Neuronen), grün dargestellt sind mit BrdU markierte Zellen (neu gebildete Zellen); die doppelt-positiv markierten Zellen entsprechen neu gebildeten Neuron. (Vergr.: 400x)

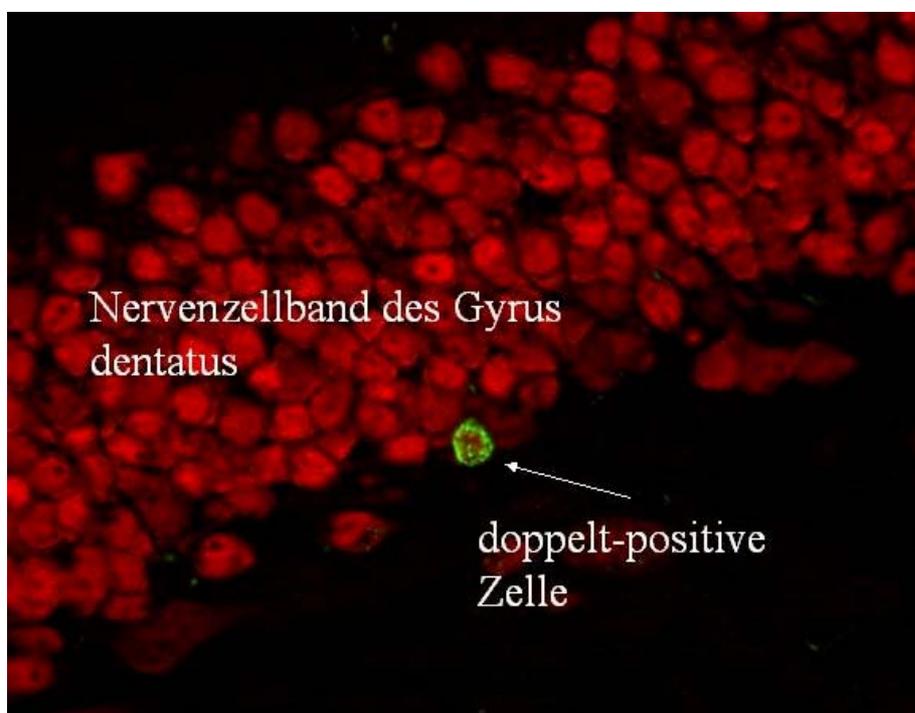


Abb. 21. Nativ-Gruppe.

Repräsentative Fluoreszenzdarstellung neu gebildeter Nervenzellen im Gyrus dentatus nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen bei Scheinversuchs-Gruppen und in der Nativ-Gruppe. Rot dargestellt sind mit NeuN markierte Zellen (Neuronen), die doppelt-positiv markierte Zelle (grün-rot) entspricht einem neu gebildeten Neuron. (Vergr.: 400x)

4 DISKUSSION

Adulte neuronale Stammzellen sind in den letzten Jahren in das Zentrum der neurologischen Forschung vorgerückt. Neue Nervenzellen werden überwiegend in zwei Gehirnregionen des erwachsenen Organismus gebildet. Eine Region ist die subventrikuläre Zone des Seitenventrikels, die andere ist der Gyrus dentatus. So genannte Vorläuferzellen wandern hier aus der subgranulären Körnerzellschicht in die Granulärschicht ein, wo sie sich in Gliazellen oder in Nervenzellen ausdifferenzieren. Diese physiologische Neubildung hält ein Leben lang an. Eine Verstärkung der Neurogenese konnte nach unterschiedlichen Hirnläsionen (Trauma, epileptischer Anfall, Ischämie) nachgewiesen werden. Die neu gebildeten Zellen waren nicht nur in der Lage, in die geschädigten Gebiete einzuwandern, sondern sich auch dort zu funktionierenden Nervenzellen zu differenzieren und sich einzugliedern. Deshalb erhofft man sich, chronische wie auch akute neuronale Schädigungen durch adulte endogene Stammzellen ersetzen zu können. In verschiedenen Studien zur Untersuchung der adulten Neurogenese nach fokaler und globaler zerebraler Ischämie wurden die unterschiedlichsten Anästhetika verwendet.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Anästhetika generell einen Einfluss auf neuronale Stammzellen und die Bildung neuronaler Vorläuferzellen besitzen. Dazu werden die Wirkungen der volatilen Anästhetika Sevofluran und Halothan in einem Modell der inkompletten globalen zerebralen Ischämie mit Reperfusion bei der Ratte verglichen. Des Weiteren soll untersucht werden, ob eine mögliche Beeinflussung durch das Sevofluran von unterschiedlichen Dosierungen abhängt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die hier untersuchten Anästhetika zur Narkose der Versuchstiere in den verwendeten Dosierungen offenbar keinen Einfluss auf die Neurogeneserate nach künstlich induzierter Ischämie haben. Die Neurogeneserate lag bei allen Untersuchungsgruppen bei ca. 90 %. Bei Untersuchung der gesteigerten Proliferation neuronaler Vorläuferzellen nach zerebraler Ischämie ergeben sich je nach Konzentration des volatilen Anästhetikums Sevofluran allerdings unterschiedliche Ergebnisse. So findet sich in der Dosierung von 1,4 Vol% Sevo eine geringere Proliferationsrate 28 Tage nach zerebraler Ischämie als bei der Verwendung von 2,8 Vol% Sevo. Diese Beobachtung beruht möglicherweise auf einer direkten oder indirekten Wirkung des Sevofluran auf die Apoptose (programmierter Zelltod) neu gebildeter Zellen. Apoptose führt zu einer Vernichtung überzähliger neu gebildeter Zellen, um so ein ständiges Wachstum des Gehirns zu verhindern.

Es wäre denkbar, dass Sevofluran in einer Konzentration von 1,4 Vol% weniger Einfluss auf die Apoptoserate besitzt als in der doppelten Konzentration.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Wahl der Tierart

Nagetiere, insbesondere Ratten, Mäuse und Gerbils sind die am häufigsten eingesetzten Versuchstiere in der Ischämieforschung. Gegenüber dem Einsatz größerer Tiere wird die Ratte bevorzugt eingesetzt, da deren Aufzucht, Haltung und Anschaffung mit geringeren Kosten verbunden sind. Durch die geringere Gehirngröße werden nicht nur die Materialkosten für die histologischen Untersuchungen geringer gehalten, sondern auch die Aufbereitungs- und Untersuchungszeiten der Präparate. Die Ratte wird sehr oft in Untersuchungen der adulten Neurogenese verwendet, da die adulte Neurogenesefähigkeit von Nagern sehr ähnlich der des Menschen ist. Ein Vorteil bei der Wahl der Ratte ist auch, dass alle verwendeten Antikörper für Proliferation und Differenzierung der neu gebildeten Nervenzellen für die Ratte vorhanden und erprobt sind.

4.1.2 Ischämiemodell

Die Grundlagenforschung der zerebralen Ischämie beruht auf Tiermodellen, da sich solche Untersuchungen am Menschen aus ethischen und moralischen Gründen weitestgehend verbieten. Auch ist es schwierig, neue therapeutische Ansätze an Menschen zu erforschen. So können Ursachen und Ausprägung menschlicher ischämischer Schadensprozesse unterschiedliche Variationen zeigen, abhängig von Lebensalter, der genetische Disposition und zusätzlichen Erkrankungen der Betroffenen. Deswegen sind vergleichende Untersuchungen am Menschen nicht geeignet. Gerade im Bereich der zerebralen Ischämieforschung müssen die Ergebnisse reproduzierbar sein, um die Aussagekraft der Ergebnisse besser beurteilen zu können. Das ideale Tier für globale Ischämie-Studien stellt der Gerbil aufgrund seiner anatomischen Gefäßverläufe dar. Gerbils besitzen keine *A. communicans posterior*, der *Circulus arteriosus Willisii* ist nur unvollständig ausgebildet. Diese anatomische Besonderheit ermöglicht die Erzeugung einer nahezu vollständigen globalen Ischämie wie sie beim Menschen vorkommt, durch alleinigen Verschluss der beiden Halsschlagadern ohne weiteren größeren operativen Aufwand. Gerbils sind aber zu klein, um ein ausgiebiges Monitoring durchführen zu können. In dieser Studie erfolgen die Untersuchungen bewusst an Ratten, da diese Tiere durch ihr höheres Körpergewicht ein

besseres Monitoring der physiologischen Parameter gewährleisten. Das Monitoring ist eine wichtige Voraussetzung, um einen reproduzierbaren Schaden zu erzeugen (TRAYSTMAN 2003). Da die Ratte allerdings eine ausgeprägte Kollateralgefäßversorgung des Gehirns besitzt, erfordert deren Einsatz eine zusätzliche Blutdrucksenkung auf Werte unter 50 mmHg, um die zerebrale Durchblutung des Gehirns ausreichend zu senken.

Die Ischämiedauer wird in der vorliegenden Studie auf 10 min festgelegt, da bei kürzerer Dauer der resultierende Zellschaden zu gering ist (SMITH et al. 1984) und bei längerer Dauer die Mortalität der Versuchstiere stark ansteigt (GROGAARD et al. 1986).

Das BCAA-Modell ist besonders geeignet für die Untersuchung der hippokampalen Neurogenese nach zerebraler Ischämie, da ein neuronaler Schaden dabei selektiv vor allem in der CA1-Region des Hippokampus auftritt (ITO et al. 1975; DUVERNOY 1988).

Die hohe Reproduzierbarkeit des Modells ermöglicht eine relativ gute Simulation der klinischen Verhältnisse, wie sie zum Beispiel nach Herz-Kreislauf-Stillstand mit anschließender Wiederbelebung oder während Gefäß- und neurochirurgischen Operationen auftreten können. Da der Vorgang der adulten Neurogenese von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, ist diese Studie nur unter intakten In-vivo-Verhältnissen möglich. Die komplexen Gegebenheiten des Gehirns können derzeit In-vitro nicht nachgestellt werden. Aus den oben genannten Gründen kann diese Untersuchung auch nicht durch eine Computersimulation ersetzt werden. Von besonderer Wichtigkeit in dieser Studie ist es, die Haltungsbedingungen für alle Ratten gleich zu halten, um äußere Einflüsse auf die Neurogeneserate zu vermeiden. Käfigausstattung und Futter waren für alle Tiere gleich, keines der Tiere durfte ein gesondertes Handling erfahren.

4.1.3 In-vivo-Markierung der Stammzellen und deren Nachkommen

Zum Einsatz kommt ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung der Proliferations- und Differenzierungsrate adulter Vorläuferzellen, das sich auch bei der Ratte bewährt hat. Da es zum heutigen Zeitpunkt noch keine direkten Marker für Stammzellen und deren Nachkommen In-vivo gibt, wird der Proliferationsmarker BrdU eingesetzt. BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches nach systemischer Applikation während der S-Phase des Zellzyklus mit dem Thymidin um den Einbau in die DNS konkurriert. Dabei beträgt die Bioverfügbarkeit von BrdU im Körper zwei Stunden (PHUPHANICH und LEVIN 1985).

Die BrdU-Färbung ist derzeit die bevorzugte Methode zur Untersuchung der adulten Neurogenese In-vivo (DEL RIO und SORIANO 1989). Einmal in die DNS eingebaut, können diese Zellen solange sie leben immunhistochemisch nachgewiesen werden, allerdings erfolgt eine Verringerung des BrdU-Signals durch fortlaufende Zellteilung (WARD et al. 1991). Eine

DISKUSSION

einzigste Injektion pro Tag kann nicht alle Zellen markieren, die sich während der 24 h teilen. Um den quantitativen Einfluss einer fortgesetzten Teilung markierter Zellen in der Abwesenheit von BrdU möglichst gering zu halten, wurden die Injektionen über einen Zeitraum von sieben Tagen ausgeführt.

Zellen, die BrdU eingebaut haben, können unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers immunhistochemisch sichtbar gemacht werden (GRATZNER 1982). Außerdem ermöglicht der Einsatz von BrdU in Kombination mit einem Marker für Nervenzellen eine Doppelfärbung zur Darstellung neu gebildeter Neuronen. Die Vorteile gegenüber der ³H-Thymidine-Autoradiographie sind die einfachere Handhabung, keine radioaktive Strahlung, deutlich geringerer Zeit- und Kostenaufwand und die Möglichkeit der Doppel- und Dreifachfärbung mit weiteren Zellmarkern.

Die in der Literatur beschriebene alternative Methode zur Markierung neuronaler Stammzellen und deren Tochterzellen mit einem Retrovirus findet in der vorliegenden Studie keine Anwendung, da dieses Verfahren äußerst aufwendig ist. Außerdem können Retroviren im zentralen Nervensystem nur unter erschwerten Bedingungen eingebracht werden (SCHINSTINE und GAGE 1993) bzw. kommt es in Stamm- und Vorläuferzellen nachgewiesenermaßen zu einem Verlust der retroviralen Expression (KLUG et al. 2000).

Zusätzlich zu den exogenen Proliferationsmarkern BrdU und ³H-Thymidin gibt es auch die endogenen Mitosemarker Ki-67 und Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Diese Marker sind nukleäre Proteine, die während der Zellteilung exprimiert werden und über immunhistochemische Nachweismethoden dargestellt werden können. Beide werden oft zur Messung der Zellproliferation eingesetzt. Allerdings sind sie für Studien, die die Neubildung von Nervenzellen 28 Tage nach neuronaler Schädigung untersuchen, nicht geeignet, da neu gebildete ausdifferenzierte Nervenzellen den Zellzyklus abgeschlossen haben (COOPER-KUHN und KUHN 2002).

Die intraperitoneale Injektion von BrdU in Ischämiestudien wird teilweise kritisiert, weil man sich die Zunahme der BrdU-positiven Zellen lediglich durch den Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke mit damit verbundener gesteigerter BrdU-Aufnahme erklärt. In einer Studie von KEE et al. (2002) konnte durch gleichzeitigen Gebrauch von Ki-67 und BrdU gezeigt werden, dass die Verstärkung des BrdU-Signals nicht ein Artefakt darstellt, sondern auf einer tatsächlichen gesteigerten Zellproliferation beruht.

Ein weiterer Kritikpunkt, der die Verwendung von BrdU betrifft, ist die Frage, ob sich BrdU nur in teilenden Zellen einlagert, oder ob es auch zu einer Markierung von DNS Reperaturvorgängen in postmitotischen Zellen kommt. Während eine Expression in der Zeit

von Zellreparationsvorgängen für PCNA und Ki-67 nicht ausgeschlossen werden kann (YU et al. 1992), können COOPER-KUHN und KUHN (2002) dies für die systemische Gabe von BrdU verneinen.

Es gibt Untersuchungen, dass BrdU in hohen Dosen eine kanzerogene und mutagene Wirkung hat. Aufgrund der Größe des Bromatoms kann der Einbau von BrdU das Risiko für Chromosomenschäden erhöhen (BANNIGAN und LANGMAN 1979; ANISIMOV und OSIPOVA 1993). Die häufig in Proliferationsstudien verwendete Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht wird gemäß einem eigenen Vorversuch auf 100 mg/kg erhöht, um die histologische Darstellung der BrdU-markierten Zellen zu verbessern. Es wurden keinerlei Nebenwirkungen durch die erhöhte Dosis bei den Tieren beobachtet. Zur Applikation von BrdU wird der i.p. Weg gewählt, da die Dosierung über das Trinkwasser durch die variable Trinkmenge sehr ungenau ist. Da Stress die Zellproliferation hemmt, wird die Belastung für die Tiere bei der intraperitonealen Injektion so gering wie möglich gehalten. Die Tiere wurden erst aus den Käfig entnommen, nachdem alle notwendigen Vorbereitungen zum Spritzen abgeschlossen waren. Während der Injektion werden die Tiere so kurz wie möglich durch die ihnen vertrauten Tierpfleger fixiert, die Injektionen führen Tierärzte durch.

4.1.4 Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Die Volumenbestimmung des Gyrus dentatus erfolgt in der vorliegenden Untersuchung anhand der HE-gefärbten Gehirnschnitte. Zur Volumenbestimmung werden die einzelnen Gehirnschnitte mit Hilfe einer Kamera auf einen Computerbildschirm übertragen. Die Software ermöglicht eine optimale Bildeinstellung, sodass ein möglichst exaktes Arbeiten gewährleistet wird. Die Kalibrierung des Gerätes wird vor jeder Auswertung erneut überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Da das Umfahren des Gyrus dentatus mit der Hand erfolgt, wird zur Vermeidung Untersucher-bedingter Schwankungen beim Ziehen der Grenzlinien, diese Auswertung nur von einer einzigen geschulten Person im Blindversuch vorgenommen. Das Computerprogramm berechnet die Fläche des umfahrenen Bezirks automatisch. Aus den ermittelten Werten kann das Volumen berechnet werden.

Diese recht zuverlässige Methode wird zur Bestimmung von Infarkt volumina nach zerebralen Läsionen verwendet, eignet sich aber nach eigener Erfahrung auch sehr gut zur Volumenbestimmung des Gyrus dentatus (OKUNO et al. 2001).

4.1.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Routinelaborfärbung und dient zur Übersichtsdarstellung. Trotz geringer Materialkosten und geringem Zeitaufwand liefert sie aussagekräftige und wertvolle

Ergebnisse. Der Einsatz der HE-Färbung dient in Studien zur zerebralen Ischämie vor allem der Untersuchung der neuronalen Schädigung. Kommt es während der Ischämie zu einer Laktatanhäufung in der Nervenzelle, verschiebt sich der pH-Wert der Zelle in den sauren Bereich. Die Zelle wird nun durch das Eosin rot angefärbt, nicht geschädigte Zellen hingegen werden blau angefärbt. Da der HE-Färbevorgang optisch kontrolliert und die Färbung bei gewünschtem Farbergebnis jederzeit abgebrochen werden kann, sind individuelle Variationen möglich. So wurde vor Beginn der Studie die optimale Färbezeit für die Schnittdicke von 40 µm durch verschiedene Färbestreihen ermittelt. Nach einer Untersuchung von CRAIN et al. (1988) führt die HE-Färbung bei der Analyse des neuronalen Gewebeschadens nach globaler zerebraler Ischämie zu vergleichbaren Ergebnissen mit anderen Färbungen wie z.B. mit der Kresyl-Violett oder mit der Silberfärbung.

4.1.6 BrdU-Färbung

Die BrdU-Färbung stellt ein einfach durchzuführendes und reproduzierbares, quantitatives immunhistochemisches Nachweisverfahren für proliferierende Zellen dar (DEFAZIO et al. 1987).

Da sich BrdU mit einem monoklonalen Antikörper nachweisen lässt (GRATZNER 1982), kann man davon ausgehen, dass sich alle markierten Zellen zu dem Zeitraum der BrdU-Gabe geteilt haben müssen und dabei BrdU in den Zellkern eingebaut haben. Bevor die Zugabe des Antikörpers erfolgen kann, muss die DNS der gesuchten Zellen denaturiert werden, da nur in der einzelsträngigen DNS eine Antikörperbindung erfolgen kann. Dies kann durch eine Inkubation in Säure oder durch eine Wärmeinkubation erreicht werden. In der vorliegenden Studie wurden beide Verfahren in einem Schritt kombiniert. Das Färbeargebnis der BrdU-Färbung hängt entscheidend vom Färbeprotokoll ab. Ziel sollte es sein, einen optimalen Kontrast zwischen positiven und negativen Zellen bei gleichzeitiger minimaler unspezifischer Hintergrundfärbung zu erhalten. Zur Vermeidung einer unvollständigen oder zu schwachen Antigen-detektion sollten die Antikörperkonzentrationen individuell an die Gewebeschnittdicke angepasst werden. In mehreren Färbestreihen wurde die Konzentration des Primärantikörpers ermittelt und auf 1:500 festgelegt, auch die Konzentration des sekundären Antikörpers wurde auf 1:500 festgelegt. Alle verwendeten Antikörper wurden sofort nach Erhalt portioniert und danach zur längeren Haltbarkeit eingefroren. Es wurde strengstens darauf geachtet, alle im Protokoll festgesetzten Inkubationszeiten im zeitlichen Rahmen zu halten. Die Verwendung zweier Antikörper (indirekte Methode) führt zur einer Signalverstärkung, die über eine weitere Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Die Farbreaktion zur Sichtbarmachung der markierten Zellen wird mit der nach HSU et al. (1981)

etablierten ABC-Methode durchgeführt, die sich als ein sensitives Nachweisverfahren erwiesen hat.

Da den Zellkernen, bei der von uns gewählten 1x täglichen BrdU-Gabe, der Marker nicht während ihrer gesamten Synthesephase für den Einbau in die DNS zur Verfügung steht (Dauer der S-Phase 6-8 h; Bioverfügbarkeit von BrdU 2 h), kommt es zu einer unterschiedlich starken Anfärbung der Zellkerne, die nicht immer eine sofortige, eindeutige Zuordnung zu positiven oder negativen Zellen erlaubt (GOLDSWORTHY et al. 1991). Um dieses Problem zu umgehen, wurde vor Beginn der Studie festgelegt, dass bei der Auswertung jeder schwach angefärbte sowie ungleichmäßig angefärbte Zellkern als BrdU-positive Zelle gezählt wird. Zur Vermeidung untersucherbedingter Schwankungen erfolgte die Auswertung durch eine Person, die ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit war, also im Blindversuch.

Eine Kontrolle der Spezifität der Antikörper erfolgte durch regelmäßige Negativkontrollen. In den Kontrollschnitten wurde der gegen BrdU gerichtete primäre Antikörper weggelassen, es konnten dabei keine unspezifischen Farbreaktionen beobachtet werden, sodass man von einer sehr hohen Spezifität der Antikörper ausgehen kann. Die BrdU-Färbung erlaubt keine Aussage über den Phänotyp der markierten Zellen, sodass in Studien zur Untersuchung der Neurogeneserate eine zusätzliche Färbung durchgeführt werden muss.

4.1.7 Doppelfärbung

Um den Prozentsatz an neu entstandenen Nervenzellen von der ermittelten Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus ermitteln zu können, wird eine immunfluoreszierende Doppelfärbung durchgeführt. Dieses Verfahren wird in Studien zur Untersuchung der adulten Neurogenese routinemäßig eingesetzt. Die histologische Untersuchung der Gehirne erfolgt nach 28 Tagen. Dieser Zeitraum gewährleistet eine ausreichende Zeit für die neuronale Differenzierung der proliferierten Vorläuferzellen (KEE et al. 2001).

Zur Detektion der neu gebildeten Nervenzelle wird der neuronale Marker NeuN verwendet, welcher ein etablierter spezifischer Marker für ausdifferenzierte Nervenzellen darstellt (MULLEN et al. 1992; WOLF et al. 1996). SCHMIDT-KASTNER et al. (1995) konnten zeigen, dass NeuN auch speziell für globale Ischämie-Studien an der Ratte geeignet ist.

Die exakte Einhaltung des Färbeprotokolls sollte durchgehend eingehalten werden. Daher werden alle Färbungen ausschließlich von zwei mit der Färbung vertrauten Personen durchgeführt. Da bei dieser Färbemethode nur monoklonale Antikörper verwendet werden, kann man von einer hohen Spezifität der einzelnen Antikörper ausgehen. Monoklonale Antikörper bilden nur mit dem gesuchten Antigen einen Antigen-Antikörper Komplex, es

DISKUSSION

kommt zu einer geringeren Hintergrundanfärbung als bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern (PASTERNAK 1997). Wie schon in der BrdU-Färbung wurde in mehreren Färbestreifen die erforderliche Antikörperkonzentration ermittelt. Sie beträgt für den ersten Antikörper 1:500 und für den zweiten 1:250. Die Durchführung von Negativkontrollen bestätigte des Weiteren die geringe unspezifische Hintergrundanfärbung durch die verwendeten monoklonalen Antikörper. Alle Antikörper wurden nach der Lieferung sofort portioniert und zur Verlängerung der Haltbarkeit bei -20°C gelagert.

Da der zweite Antikörper bei Einwirkung durch Licht schnell verblasst, ist es wichtig, alle folgenden Arbeitsschritte im Dunkeln auszuführen und beim Eindecken der Objektträger ein spezielles Fluoreszenzeindeckmedium zu verwenden.

Die Immunfluoreszenzfärbung erfordert den Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops. Dabei ist es wichtig, dass das Fluoreszenzsignal in den einzelnen Gehirnschnitten konstant bleibt, dies erfordert eine möglichst schnelle Auswertung (2 bis 3 Tage) nach dem Färben.

Das ApoTom gibt einen konstanten Ebenenbereich von 1 µm wieder und vermeidet so falsch positive Signale durch Zellen, die übereinander liegen und sich so als eine einzelne doppelt markierte Zelle darstellen könnten. Da es bei gleichzeitiger Öffnung des Strahlenganges für beide Fluoreszenzsignale zu störenden Überkreuzungsreaktionen des FITC und Rhodamin Signals kommen kann, werden die Kanäle zeitlich nacheinander geöffnet. Die so gewonnenen qualitativ besseren Einzelbilder können am Computerbildschirm übereinandergelegt werden. Dies erleichtert die Auswertung, da die Beurteilung der Zellen an einem großen Bildschirm erfolgen kann. Für eine optimale Auswertung der Immunfluoreszenzschnitte ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, dass die Ausblutung des Gehirns sorgfältig durchgeführt wird, da es sonst zu einer störenden Anfärbung von Erythrozyten kommt. Sie können am Bildschirm zwar leicht von anderen Zellen durch ihre charakteristische Form und Anordnung unterschieden werden, führen aber zu einem massiven Farbstoffverlust, der die Auswertung der gesuchten Zellen unnötig erschwert.

Das Free-Floating-Verfahren wurde aus Platz- und Kostengründen gewählt. Da bei dieser Methode die Gehirnschnitte nicht auf einem Objektträger fixiert sind, sondern in Netzen frei schwimmen, kommt es manchmal vor, dass Schnitte trotz eines ständigen Einsatzes von Schüttlern miteinander verkleben. Dies erfordert des Öfteren ein Nachfärben von Schnitten, was bei einem 2-tägigen Färbevorgang einen nicht unerheblichen zeitlichen Aufwand darstellt. Beim Free-Floating-Verfahren muss sehr sorgfältig gearbeitet werden, damit es beim Überführen der Schnitte mit dem Pinsel nicht zu einem Verlust oder einer Zerreißung der Schnitte kommt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Physiologische Parameter

Für die Interpretation der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse ist die Überwachung und Konstanthaltung der physiologischen Variablen von außerordentlicher Wichtigkeit. Daher werden die wichtigsten physiologischen Daten vor, während und nach der operativen Phase gemessen und in einem Protokoll schriftlich festgehalten. Dazu gehören der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die Herzfrequenz, der Gesamthämoglobingehalt, der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck, der pH-Wert, die Atemfrequenz, der Blutglukosegehalt und die perikranielle Temperatur.

Körpergewicht

Das Körpergewicht der 56 eingesetzten Versuchstiere beträgt 370 ± 10 g, es weist damit keine signifikanten Unterschiede auf und hat deshalb keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie.

Mittlerer arterieller Blutdruck

Das in dieser Studie verwendete Tiermodell beinhaltet eine durch Blutentzug erzeugte arterielle Hypotension, da durch den alleinigen Verschluss der *Aa. carotides communes* keine ausreichende Reduzierung der Gehirndurchblutung erreicht wird. Alle BCAO-Gruppen zeigen erwartungsgemäß einen versuchsbedingten, signifikanten Abfall des Blutdrucks auf 40 mmHg gegenüber den SV-Gruppen und der Nativtier-Gruppe. In der Erholungsphase pendeln sich diese Werte wieder in den physiologischen Bereich ein.

Herzfrequenz

Die Herzfrequenz liegt bei allen Versuchstieren während des gesamten Versuchsablaufs im physiologischen Bereich und hat daher keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Gesamthämoglobin

Die gemessenen Werte des Gesamthämoglobins bewegen sich während des Versuchs bei allen Tieren bis zum Zeitpunkt des Blutentzuges in physiologischen Bereichen.

Protokollgemäß kommt es bei allen BCAO-Gruppen durch die Induktion der hämorrhagischen Hypotension über 10 min zu einem Abfall der Hämoglobinkonzentration.

DISKUSSION

In der anschließenden Reperfusion- und Erholungsphase kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Hämoglobinkonzentration gegenüber dem Ausgangswert, da in dieser Phase das vorher entzogene Blut wieder zurück infundiert wird. Da der Anstieg der Hämoglobinkonzentration bei allen drei BCAO-Gruppen in der gleichen Größenordnung stattfindet, nehmen die Schwankungen keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studie.

Blutgase

Die Notwendigkeit einer Konstanthaltung der Blutgaswerte besteht, da VANICKY et al. im Jahr 1992 eine Studie veröffentlichten, in der die neuroprotektive Wirkung einer Hyperventilation mit damit verbundener CO₂-Reduktion auf den ischämischen Zellschaden nachgewiesen wurde.

Um eine respiratorisch bedingte Beeinflussung auf den neuronalen Zellschaden zu vermeiden, werden zu allen vier Untersuchungszeitpunkten arterielle Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (PaO₂) und des Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO₂) vorgenommen.

Während des gesamten Versuchablaufs zeigen die Sauerstoffpartialdruckwerte aller sechs Versuchs-Gruppen geringe Schwankungen, diese liegen aber alle im physiologischen Bereich und führen damit zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Durch den künstlich erniedrigten Blutdruck kommt es in der Ischämiephase zu einem geringen Absinken des Kohlendioxidpartialdrucks in allen drei BCAO-Gruppen gegenüber den zugehörigen SV-Gruppen. Diese Veränderungen erklären sich durch den Versuchsaufbau. Das Absinken des MAP bewirkt eine Zentralisierung des Blutkreislaufs wobei die Gefäße in der Peripherie konstringieren. Das vorhandene CO₂ verbleibt im peripheren Gewebe und erscheint also in geringerer Menge in der Ausatemluft. Da sich die Veränderungen aber in allen drei BCAO-Gruppen finden, bleiben die Ergebnisse vergleichbar.

pH-Wert

Ein konstanter pH-Wert spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Ausmaß des künstlich erzeugten neuronalen Schadens. Diese Erkenntnis beruht auf einer Studie von ANDERSON und MEYER (2002), die bei einem erniedrigten pH-Wert eine Verstärkung des neuronalen Schadens und bei einem alkalischen pH-Wert einen verminderten Zellschaden zeigen konnten.

Während der Reperfusionphase zeigen sich geringere pH-Werte in den beiden Sevofluran 2,8 Vol% Gruppen (BCAO und SV). Allerdings liegen diese veränderten Werte im

DISKUSSION

physiologischen Rahmen, sodass von keinem Einfluss auf die Stärke des neuronalen Schadens ausgegangen wird.

Atemfrequenz

In zwei der drei BCAO-Gruppen zeigen sich signifikante Schwankungen in der Atemfrequenz im Verlauf des Versuchs, die aber für die Ergebnisse der Studie nicht relevant sind, da die Atemfrequenz zur Konstanthaltung des PaCO₂ künstlich reguliert wird.

Blutglukosekonzentration

Es existieren Untersuchungen darüber, dass ein hoher Plasmaglukosespiegel das Ausmaß des neuronalen Schadens beeinflusst. Kommt es in Folge einer zerebralen Ischämie zu einer Sauerstoffunterversorgung des neuronalen Gewebes, führt dies zu einem starken ATP Mangel. Statt der üblichen 38 Mol ATP aus einem Mol Glukose können nur noch zwei Mol ATP entstehen, es kommt zu einer vermehrten Bildung von Stoffwechselprodukten bei gleichzeitig verringertem Abtransport (MEHMET et al. 1998). Tiere mit hohem Glukoseausgangswert zeigen in diesem Fall einen starken Anstieg des Laktatspiegels, von dem HOFFMAN et al. (1990) einen Einfluss auf den neuronalen Schädigungsgrad zeigen konnten. So sind die negativen Folgen einer Hyperglykämie auf das Ausmaß des neuronalen Schadens und dem damit verbundenen neurologischem Endergebnis bedeutend gravierender als es unter einer Hypoglykämie der Fall ist. Um dieses zu vermeiden, werden die Tiere 12 Stunden vor der Operation nüchtern gesetzt, bei weiterhin freiem Zugang zum Trinkwasser. Ziel ist es, dass möglichst alle Tiere mit einem vergleichbaren niedrigen normoglykämischen Blutwert in den Versuch gehen. Aufgrund individuell unterschiedlicher Stressreaktion der Tiere kommt es zu geringen Schwankungen der Blutglukose, denen aber keine Bedeutung für die Endergebnisse beigemessen wird, da sie im physiologischen Rahmen liegen.

Perikranielle Temperatur

Neben der rektalen Temperatur wird zusätzlich die perikranielle Temperatur gemessen, da die beiden Werte während einer künstlich erzeugten Ischämie voneinander abweichen können (BUSTO et al. 1987).

Die ständige Überwachung der Temperatur muss während des gesamten Versuchs erfolgen, da WERNER im Jahr 1997 eine Untersuchung veröffentlichte, in der gezeigt werden konnte, dass eine Erniedrigung der perikraniellen Temperatur das Ausmaß des neuronalen Schadens deutlich reduzieren kann. Die Konstanthaltung der perikraniellen Temperatur erfolgt in dieser Studie durch eine direkt über dem Kopf des Versuchstieres angebrachte Wärmelampe. Einzig

die Hal 0,8 Vol% BCAO-Gruppe reagiert auf die Reduktion des kranialen Blutflusses mit einer kurzfristigen signifikanten Abnahme der Temperatur, was aber durch die Wärmelampe sehr schnell wieder ausgeglichen wird. Die perikranielle Temperatur liegt bei den restlichen Tieren während des gesamten Versuchs ohne bedeutende Schwankungen im physiologischen Bereich von 37,5 °C. Somit lassen sich Beeinflussungen der Ergebnisse durch Unterschiede in der perikraniellen Temperatur ausschließen.

4.2.2 Histologische Untersuchungen

Ergebnisse der HE-Färbung

Eine globale zerebrale Ischämie führt zur verzögerten selektiven neuronalen Vulnerabilität (ITO et al. 1975; SMITH et al. 1984; PULSINELLI 1985). Darunter versteht man einen unterschiedlichen Ischämieschwellenwert der verschiedenen Zellpopulationen in unterschiedlichen Gehirnregionen. Zum Beispiel reagieren Neuronen wesentlich vulnerabler auf eine Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glukose als Endothelzellen. Neuronen des Hippokampus wiederum gehen schneller zugrunde als Neuronen des Neokortex. Die Empfindlichkeit der Zellen im Hippokampus der Ratte zeigt folgende Reihenfolge: CA1>CA3>Gyrus dentatus (DUVERNOY 1988).

Auch in der CA1-Region des menschlichen Hippokampus findet sich nach kurzfristiger globaler Ischämie durch Herz-Kreislauf-Stillstand das Phänomen des verzögerten Zelltods (PETITO et al. 1987).

Zur Untersuchung des Nervenzellschadens wurden die CA1-Region und die CA3-Region des Hippokampus ausgewertet. In dem vorliegenden Modell der inkompletten globalen Ischämie sind vor allem die vulnerablen Nervenzellen der CA1-Region beider Hemisphären von der Ischämie betroffen. Dies beruht auf der Dauer der Ischämie, die hier durch einen Vorversuch auf 10 min festgelegt wurde (ENGELHARD et al. in Vorbereitung).

Eine längere Dauer der Ischämie führt zu verstärkten Nervenzellverlusten, bedingt aber auch eine erhöhte Morbidität und Mortalität der Versuchstiere (GROGAARD et al. 1986).

Alle SV-Gruppen sowie die Nativ-Gruppe sind erwartungsgemäß frei von einem Schaden in der CA1-Region, da sie keiner Ischämiephase unterzogen werden. Die BCAO-Gruppen dagegen heben sich durch signifikante Schäden von den oben genannten Gruppen ab. Allerdings ergibt sich kein unterschiedlicher Schaden für die Hal BCAO-Gruppe gegenüber den zwei Sevo BCAO-Gruppen, sodass man davon ausgehen kann, dass die erwartete neuroprotektive Wirkung der Anästhetika in dem gewählten Modell für Halothan und Sevofluran gleich ist. Allerdings erfolgte die Erfassung des neuronalen Zellschadens in dieser

Studie nur im Überblick und daher stark vereinfacht. In tierexperimentellen Untersuchungen hat man herausgefunden, dass der lichtmikroskopisch sichtbare neuronale Zelltod nach globaler Ischämie mit Verzögerung auftritt. Veränderungen finden sich erst zwischen dem ersten bis siebten Tag nach dem ischämischen Ereignis (SCHMIDT und REYMANN 2002).

Die Untersuchungen des sich langsam entwickelnden histologisch nachweisbaren Schadens erfolgt in dieser Studie am 28. Tag nach der Ischämie, daher kann davon ausgegangen werden, dass die Entwicklung der Schädigung abgeschlossen ist.

Zu den hohen Standardabweichungen muss gesagt werden, dass die Versuchstierzahl der Versuchs-Gruppen mit je acht Tieren zu klein angesetzt sein könnte. Die großen Streuungen beruhen darauf, dass der neuronale Schädigungsgrad beim Einzeltier in diesem Modell unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Ursachen hierfür sind durchaus bekannt. Während der Ischämie kommt es zu einer unterschiedlich verlaufenden Durchblutung der kollateralen Hirngefäße der Ratten.

In der CA3-Region erlitten nur 3 von 24 Tieren einen Schaden, sodass man davon ausgehen kann, dass in dem gewählten Modell die 10 Minuten andauernde Ischämie zu keinem reproduzierbaren sichtbaren Zellschaden in dieser Region führt. Wie schon erwähnt, zeichnet sich die CA3-Region des Hipokampus gegenüber der CA1-Region durch eine geringere Vulnerabilität aus.

In Ischämie-Studien ist der Einfluss des Halothan auf den ischämischen Schädigungsgrad generell als Nachteil anzusehen. Frühere Studien belegen, dass Halothan nur eine geringe neuroprotektive Wirkung besitzt. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich allerdings, dass mit einer Konzentration von 0,8 Vol% Halothan die gleiche neuroprotektive Wirkung wie mit Sevofluran zu erzielen ist. Dies kann durch die Dauer und Stärke der Ischämie erklärt werden, die im Vergleich zu anderen Studien moderat gewählt wurde.

Ergebnisse der Volumenbestimmung des Gyrus dentatus

Die ermittelten Volumina aller untersuchten Gehirne zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Größe des Volumens des Gyrus dentatus. Es kann also ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte Proliferationsrate BrdU-positiver Zellen nach zerebraler Ischämie im Gyrus dentatus auf einer unterschiedlichen Größe des Gyrus dentatus der Tiere beruht.

Ergebnisse der BrdU-Färbung

Die physiologische Neurogeneserate im erwachsenen Säugergehirn kann durch äußere Einflüsse verändert werden. So kommt es nach experimentell erzeugten Schädigungen des Gehirns zu einer Stimulation der Proliferation und Neurogeneserate adulter Vorläuferzellen. Dieses Phänomen konnte für verschiedene Tiermodelle der globalen zerebralen Ischämie im Gyrus dentatus gezeigt werden. LIU et al. (1998) wiesen dies beim Gerbil nach. Der Nachweis bei der Maus gelang TAKAGI et al. (1999). Auch für die Ratte existieren Berichte darüber (ARVIDSSON et al. 2001; JIN et al. 2001; YAGITA et al. 2001). Sämtliche Studien beschreiben eine gesteigerte Proliferation im Gyrus dentatus unter der Verwendung verschiedenster Narkoseformen. Allerdings findet sich in der Literatur kein Hinweis auf einen möglichen Einfluss der verwendeten Anästhetika auf die ermittelten Ergebnisse. Es wäre denkbar, dass Anästhetika, für die eine neuroprotektive Wirkung auf den neuronalen Zellschaden nachgewiesen wurden, durchaus auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die endogenen Stammzellen besitzen.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse bestätigen die Befunde früherer Studien zu einer gesteigerten Proliferationsrate nach zerebraler Ischämie (LIU et al. 1998; TAKAGI et al. 1999; JIN et al. 2001). SHARP et al. (2002) wiesen nach, dass die Proliferation im Gyrus dentatus nach einer zerebralen Ischämie zwischen dem 9. bis 11. Tag maximal ist und danach eine Abnahme der markierten Zellen stattfindet. Der von uns gewählte Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ist damit nicht optimal für eine Untersuchung der Proliferation geeignet. Der bewusst gewählte Untersuchungszeitraum von 28 Tagen sichert aber ausreichend Zeit für die neuronale Ausdifferenzierung der gebildeten Vorläuferzellen (SCHMIDT und REYMANN 2002). Um die natürlich vorkommende Proliferation und Neubildung von Nervenzellen im Gyrus dentatus des Hippokampus dazustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine zusätzliche Versuchstier-Gruppe gebildet, welche aus acht Nativtieren (Nativ-Gruppe) besteht. In der Nativ-Gruppe und in allen drei SV-Gruppen wurde nach vier Wochen eine vergleichbar geringe Anzahl an BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus gefunden. Die durch die Ischämie entstandene Läsion der CA1-Region führt allerdings nur in zwei der drei BCAO-Gruppen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation von Vorläuferzellen gegenüber den jeweiligen SV-Gruppen. In der Sevo 1,4 Vol% BCAO-Gruppe ergibt sich lediglich eine tendenzielle Erhöhung gegenüber der Sevo 1,4 Vol% SV-Gruppe.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist es wichtig, dass alle Tiere unter identischen standardisierten Bedingungen gehalten werden. Keines der Tiere erhielt z.B. eine zusätzliche

DISKUSSION

Käfigausstattung oder ein anderes Futter, sodass die Umwelteinflüsse für alle Tiere gleich minimiert waren und nicht als Ursache für die ermittelten Ergebnisse in Frage kommen.

Es lässt sich also feststellen, dass Tiere, die während der Ischämiephase mit Sevofluran 1,4 Vol% in Narkose lagen, nach 28 Tagen weniger BrdU-positive Zellen aufweisen als Tiere, die mit 2,8 Vol% Sevofluran oder mit 0,8 Vol% Halothan behandelt wurden.

Es stellt sich nun die Frage, ob die erniedrigte Zellzahl auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, oder ob die Ursache hierfür in einer verringerten Proliferationsrate liegt.

Apoptose spielt nicht nur während der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle in der Regulation der endgültigen Zellzahl, sondern kommt auch als physiologisches Ereignis im Gyrus dentatus adulter Säugetiere vor (BIEBL et al. 2000; WINNER et al. 2002). Die adulte Neurogeneserate hängt also nicht alleine von einer Proliferation der Vorläuferzellen ab sondern auch von der anschließenden apoptotischen Elimination überzähliger neu gebildeter Zellen. Es besteht eine enge Beziehung zwischen Zellentstehung und Zelluntergang. Dieses Zusammenspiel wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert, von denen viele noch unbekannt sind.

Es wäre denkbar, dass Sevofluran auf den Mechanismus der Apoptose einwirkt und konzentrationsabhängig zu einer Reduktion des Absterbens neu gebildeter Zellen nach zerebraler Ischämie führt. Diese Annahme wird durch In-vivo- und In-vitro-Studien unterstützt.

ENGELHARD et al. zeigten im Jahr 2001, dass vier Stunden nach einer zerebralen Ischämie unter einer Sevoflurannarkose die Menge an Apoptose-fördernden Proteine gegenüber einer Kontroll-Gruppe deutlich geringer ist und folglich die Apoptose gehemmt wird. Auch nach 28 Tagen konnte in der Sevofluran-Gruppe eine erhöhte Menge an Apoptose-hemmenden Proteinen und eine erniedrigte Menge an Apoptose-fördernden Proteine in den Zellen gefunden werden (ENGELHARD et al. 2004).

WISE-FABEROWSKI et al. (2003) untersuchten in einem In-vitro-Modell den Einfluss von Sevofluran auf den apoptotischen Zelltod kortikaler Neuronen nach künstlichem Sauerstoff- und Glukoseentzug. Auch In-vitro wurde eine Verminderung der Apoptoserate durch Sevofluran ermittelt, wobei die Verminderung mit höheren Konzentrationen des Anästhetikums stärker ausfällt.

Es liegt also nahe zu vermuten, dass die geringere Zellzahl in der Sevo 1,4 Vol% BCAO-Gruppe nach 28 Tagen auf eine erhöhte Apoptoserate der Vorläuferzellen zurückzuführen ist, hingegen die höhere Zellzahl der Sevo 2,8 Vol% BCAO-Gruppe aufgrund einer stärkeren Hemmung des Zelltodes durch Sevofluran bedingt ist. Die in dieser Arbeit ermittelten

Ergebnisse lassen einen potenziellen konzentrationsabhängigen Effekt des Sevoflurans auf die Apoptoserate proliferierter Vorläuferzellen vermuten. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob eine Unterdrückung des Zelltodes durch Sevofluran wiederum zu einer vermehrten Nervenzellneubildung führt (s. unten).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen können aber auch auf einer gesteigerten bzw. verminderten Proliferationsrate beruhen. Es ist bekannt, dass es während einer ischämischen Nervenzellschädigung zu einer gesteigerten Glutamat-Ausschüttung kommt. In zwei fokalen Ischämiestudien von LIU et al. (1998) und ARVIDSON et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass eine systemische Verabreichung von NMDA-Rezeptor Blockern zu einer Hemmung der normalerweise nach einer Ischämie einsetzenden gesteigerten Proliferation kommt. Das Inhalationsanästhetikum Sevofluran hat auch einen Einfluss auf exzitatorische Neurotransmitter. So reduziert Sevofluran die Glutamat-Freisetzung im Gehirn (VINJE et al. 2002).

TONER et al. (2001) sowie ENGELHARD et al. (2003) konnten ebenfalls eine verringerte Glutamat-Freisetzung nach zerebraler Ischämie unter Sevoflurannarkose zeigen. Diese Untersuchungen erfolgten nur für niedrig dosiertes Sevofluran entsprechend der eigenen Sevofluran-Gruppen. Ursächlich für die hierbei beobachtete geringere Proliferationsrate in der Sevo 1,4 Vol% BCAA-Gruppe könnte also eine eventuell geringere Glutamat-Ausschüttung im Vergleich zur Sevo 2,8 Vol% BCAA-Gruppe sein.

Ob nun die erniedrigte Zellzahl BrdU-positiver Zellen in der Sevo 1,4Vol% BCAA-Gruppe auf einer vermehrten Apoptoserate beruht, oder ob es von Haus aus zu einer verringerten Proliferation kam, kann mit dem Untersuchungsaufbau dieser Studie nicht geklärt werden. Eine zusätzliche Untersuchung der Überlebensrate, verglichen mit der Proliferation nach sieben und 28 Tagen nach dem ischämischen Insult, könnte hier Klärung bringen. Zur Identifizierung apoptotischer Vorgänge könnte in einer weiteren Studie das Auftreten Apoptose-spezifischer Marker untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse haben neue Fragen zur Untersuchung der adulten Neurogenese aufgeworfen. Diese Aspekte müssen in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Ergebnisse der Doppelfärbung

Die Doppelfärbung erlaubt die qualitative Analyse des Phänotyps der neu gebildeten Zellen. In der Literatur wird die Zeit, die für die Ausdifferenzierung der neu gebildeten Nervenzellen notwendig ist, mit 3 bis 5 Wochen angegeben (KEE et al. 2001).

DISKUSSION

Der in den eigenen Untersuchungen gewählte Beobachtungszeitraum von 28 Tagen wird auch von anderen Forschungsgruppen verwendet (SCHMIDT und REYMANN 2002). Adulte hippocampale Neurogenese im Gyrus dentatus konnte in allen sieben Untersuchungs-Gruppen nachgewiesen werden. Das Ergebnis der höheren Anzahl doppelt-positiv markierter Zellen in den BCAO-Gruppen beruht auf der durch die Ischämie ausgelösten höheren Proliferationsrate. Der Prozentsatz neu gebildeter Neuronen betrug für alle Gruppen ca. 90 %. Die restlichen 10 % BrdU-positiver Zellen wies keine Doppelmarkierung auf. Diese können entweder undifferenzierte Vorläuferzellen oder aber differenzierte Zellen sein, deren Phänotyp in dieser Untersuchung nicht erfasst wurde (z.B. Gliazellen oder Entzündungszellen). Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass zumindest die während einer künstlich erzeugten Ischämie verwendeten Anästhetika über einen Zeitraum von 2 h keinen Einfluss auf Zellen der neuronalen Entwicklungslinien (Neurogenese) haben. Eine längere Narkosedauer könnte vielleicht zu anderen Ergebnissen führen.

Mehr Nervenzellen führen in funktionellen Tests nicht unbedingt zu einem besseren neurologischen Endergebnis. Mäuse mit einer gesteigerten Neurogeneserate schnitten in einer Untersuchung von RONDI-REIG et al. (2001) in Verhaltenstests deutlich schlechter ab als Wildtyp-Mäuse. Hinsichtlich dieser Beobachtung wäre es interessant, in zukünftigen Studien die histologischen Untersuchungen mit Verhaltenstests, die die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere untersuchen, zu ergänzen.

Das Erreichen von deutlichen Trends und seltenen tatsächlich signifikanten Ergebnissen beruht wahrscheinlich auf den zu klein gewählten Tiergruppen in diesem Versuch. Da die adulte Neurogenese durch viele Faktoren beeinflusst wird, müssen die Tierzahlen der verschiedenen Versuchsgruppen größer gewählt werden, um auftretende "Ausreißer" besser kompensieren zu können. Weitere Studien sind notwendig, um zu untersuchen, ob eventuell andere Anästhetika einen Einfluss auf die neuronale Ausdifferenzierung haben. Für die verwendeten Anästhetika dieser Studie wäre es wünschenswert, in weiteren Untersuchungen zu zeigen, ob eine längere Narkosedauer (>2 h) zu anderen Ergebnissen führt.

4.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stellen sich wie folgt dar:

- 1) Sowohl Sevofluran als auch Halothan können in Tierversuchen zur inkompletten zerebralen Ischämie als Anästhetika eingesetzt werden, da sie während einer Narkosedauer von 2h keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Neurogeneserate nach zerebraler Ischämie zeigen.
- 2) Sevo 1,4Vol % zeigt im Vergleich zu 2,8Vol% eine niedrigere Proliferationsrate adulter Vorläuferzellen 28 Tage nach einem ischämischen Insult. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lassen einen potentiellen konzentrationsabhängigen Effekt des Sevofluran auf die Apoptoserate proliferierter Vorläuferzellen vermuten. Um diese Beobachtung zu untermauern sind weitere Untersuchungen erforderlich.

An die therapeutische Nutzung adulter neuronaler Stammzellen knüpfen sich hohe Erwartungen. Neben einem möglichen Einsatz für chronische neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer erhofft man sich auch eine Therapiemöglichkeit durch endogenen Zellersatz nach akuten Nervenzellverlusten, die nach Ischämien jeglicher Form auftreten. Speziell im Bereich der Anästhesie stellen kurzfristige zerebrale Minderdurchblutungen, die während neurochirurgischer Eingriffe auftreten können, ein zentrales Problem dar.

Der gegenwärtige Wissensstand über Grundlagen adulter neuronaler Stammzellen stammt überwiegend aus Tierversuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse für den Einsatz von Anästhetika in tierexperimentellen Modellen im Bereich der Ischämieforschung. Sie dienen zur weiteren Qualitätssicherung des Modells der beidseitigen inkompletten zerebralen Ischämie mit Reperfusion und können somit beitragen, das endogene therapeutische Potential adulter Stammzellen besser erforschen zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der adulten Ratte nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie und deren Beeinflussung durch Sevofluran

Weltweit werden Untersuchungen durchgeführt, die sich mit zerebraler Ischämie und deren Interaktion auf neuronale Stammzellen beschäftigen. Obwohl die meisten Studien narkotisierte Versuchstiere verwenden, ist bislang in der Literatur nichts über eine mögliche Beeinflussung adulter neuronaler Stammzellen nach zerebraler Ischämie durch Anästhetika beschrieben worden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die konzentrationsabhängige Wirkung von Sevofluran auf die adulte Neurogenese im Gyrus dentatus der Ratte nach inkompletter globaler zerebraler Ischämie gegenüber einer mit Halothan anästhesierten Vergleichs-Gruppe zu untersuchen. Die Tiere wurden dazu randomisiert in die folgenden Gruppen eingeteilt: Je drei Ischämie (BCAO)-Gruppen stehen drei Scheinversuch (SV)-Gruppen gegenüber: Gruppe 1 (Sevofluran 1,4 Vol%, BCAO), Gruppe 2 (Sevofluran 2,8 Vol%, BCAO), Gruppe 3 (Halothan 0,8 Vol%, BCAO), Gruppe 4 (Sevofluran 1,4 Vol%, SV), Gruppe 5 (Sevofluran 2,8 Vol%, SV), Gruppe 6 (Halothan 0,8 Vol%, SV). Die Vorderhirnischämie wurde durch 10-minütigen beidseitigen Verschluss der Aa. carotides communes in Kombination mit hämorrhagischer Hypotension erzeugt. Zusätzlich zu den operierten Versuchs-Gruppen (Gruppe 1-6) existiert für die histologischen Untersuchungen eine Nativ-Gruppe (Gruppe 7) zur physiologischen Referenz. An 7 aufeinanderfolgenden Tagen wurde allen Tieren 1x täglich, beginnend einen Tag nach der Operation, 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) intraperitoneal appliziert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere in Narkose euthanasiert und mit 4 % Formalin perfundiert. Die aufbereiteten Gehirne wurden mit HE gefärbt, um den histopathologischen Schaden der CA1- und CA3-Region des Hippokampus und das Volumen des Gyrus dentatus zu ermitteln. Des Weiteren wurde eine BrdU-Immunhistochemie-Färbung zur Detektion proliferierter Zellen im Gyrus dentatus angefertigt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte die Untersuchung der neu gebildeten Zellen auf Doppelmarkierung mit BrdU und NeuN.

In der HE-Färbung ergab sich in allen BCAO-Gruppen gegenüber den jeweiligen SV-Gruppen und der Nativ-Gruppe eine Nervenzellschädigung, die innerhalb der BCAO-Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies. Dies zeigt einen vergleichbaren neuroprotektiven Effekt der Narkosemittel. Die Anzahl proliferierender Vorläuferzellen war in der Sevofluran 2,8 Vol% BCAO-Gruppe und in der Halothan 0,8 Vol% BCAO-Gruppe gegenüber den jeweiligen SV-Gruppen signifikant erhöht. In der Sevofluran 1,4 Vol%

ZUSAMMENFASSUNG

BCAO-Gruppe ergab sich hier nur eine tendenzielle Erhöhung gegenüber der dazugehörigen SV-Gruppe, für deren Ursache eine konzentrationsabhängige Beeinflussung des Sevofluran auf den apoptotischen Zelltod proliferierter Zellen vermutet wird. Der in der Immunfluoreszenz-Färbung ermittelte Prozentsatz an neugebildeten Neuronen lag bei allen Tieren bei ca. 90 %. Es zeigte sich, dass eine mit Nervenzellverlust verbundene zerebrale Ischämie zu einer deutlich gesteigerten Neurogeneserate führt, unabhängig von der Wahl des verwendeten Narkosemittels. Sowohl Sevofluran als auch Halothan können folglich als Anästhetika für die Untersuchung adulter Stammzellen verwendet werden, wobei allerdings die verwendete Konzentration des Anästhetikums eine Rolle spielt.

6 SUMMARY

The effect of sevoflurane on neuroregenerative potency after incomplete global cerebral ischemia in the dentate gyrus of the adult rat

Cerebral ischemia and its interaction on neuronal stem cells are subject to worldwide research. Although in most studies anesthetized laboratory animals are used, one can not find a description of the possible interaction of adult neuronal stem cells after cerebral ischemia through anesthetics in the literature. The goal of the present study is to examine the concentration depending effect of sevoflurane on adult neurogenesis in the dentate gyrus of the rat after incomplete global cerebral ischemia compared to a sample group anaesthetized with halothane. Animals were randomly assigned to one of the following groups: Three ischemia (BCAO)-groups were assigned compared to three sham (SV)-groups: Group 1 (sevoflurane 1,4 Vol%, BCAO), group 2 (sevoflurane 2,8 Vol%, BCAO), group 3 (halothane 0,8 Vol%, BCAO), group 4 (sevoflurane 1,4 Vol%, SV), group 5 (sevoflurane 2,8 Vol%, SV), group 6 (halothane 0,8 Vol%, SV).

Ischemia of the forebrain was induced by bilateral occlusion of the Aa. carotides communes for 10 minutes in combination with hemorrhagic hypotension. A native-group (group 7) without any treatment serves as physiological control for the histological examinations in addition to the operated test groups. Starting one day after the operation, 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) was injected intraperitoneally once daily for 7 consecutive days in all animals. After 28 days at the end of the observation period the animals were deeply anesthetized, euthanized and perfused with 4 % paraformaldehyde. The prepared brains were stained with hematoxylin and eosin (HE) in order to determine the histopathological damage in the hippocampal CA1- and CA3-regions and the volume of the dentate gyrus. Furthermore, a BrdU staining for the detection of proliferating cells in the dentate gyrus was performed. A double immunfluorescence staining was performed to analyze the newly formed cells for coexpression of BrdU and the neuronal Marker NeuN.

HE-staining revealed that nerve cell damage occurred in all BCAO-groups compared to the according SV-groups and the native-group. This damage showed no significant difference within the BCAO-groups. This shows a comparable neuroprotective effect of the anesthetic agents. The amount of proliferating cells in group 2 (sevoflurane 2,8 Vol%, BCAO) and 3 (halothane 0,8 Vol%, BCAO) was significantly higher compared to the according SV-groups. Group 1 (sevoflurane 1,4 Vol%, BCAO) showed a trend towards an increase compared to

SUMMARY

group 4 (sevoflurane 1,4 Vol%, SV). It is assumed that this is caused by a correlation between the concentration of sevoflurane and apoptotic cell death of proliferating cells. The percentage of newly born neurons was determined by immunofluorescence technique and showed equal values of approx. 90 % in all animals. These data show, that cerebral ischemia combined with nerve cell loss leads to a significantly increased rate of adult neurogenesis, independent of the chosen anesthetics. Therefore, sevoflurane as well as halothane can be used as anesthetics for the examination of adult stem cells. However, the applied concentration of the anesthetic is of importance.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abe K, Yoshida S, Watson BD, Busto R, Kogure K, Ginsberg MD
A-Tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia.
Brain Res 1983; 273: 166-169

Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA
An introduction to stem cells.
J Pathology 2002; 197: 419-423

Allen E
The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat.
J Comp Neurol 1912; 22: 547-568

Altman J
Are new neurons formed in the brains of adult mammals?
Science 1962; 135: 1127-1128

Altman J, Das GD
Autoradiographic and histological studies of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.
J Comp Neurol 1965; 124: 319-335

Anderson RE, Meyer FB
Protection of focal cerebral ischemia by alkalinization of systemic pH.
Neurosurgery 2002; 51: 1256-1266

Anisimov VN, Osipova GY
Carcinogenesis induced by combined neonatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine and subsequent total-body X-ray irradiation in rats.
Cancer Lett 1993; 70: 81-90

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O
N-methyl-d-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke.
Eur J Neurosci 2001; 14: 10-18

Bannigan J, Langman J
The cellular effect of 5-bromodeoxyuridine on the mammalian embryo.
J Embryol Exp Morph 1979; 50: 123-135

Benninghoff A, Drenckhahn D
Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie
Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut
Urban & Fischer Verlag; München; 16. Auflage 2002; S. 235, 621-648

Berkowitz ID, Gervais H, Schleien CL, Koehler RC, Dean JM, Traystman RJ
Epinephrine dosage effects on cerebral and myocardial blood flow in an infant swine model of cardiopulmonary resuscitation.
Anesthesiology 1991; 75: 1041-1050

- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A
Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates.
PNAS 2002; 99: 11464-11469
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG
Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a selfrenewing capacity in the adult rat brain.
Neurosci Lett 2000; 291: 17-20
- Brown Jr B
Sevoflurane: Introduction and overview.
Anesth Analg 1995; 81: 1-3
- Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD
Small differences in intras ischemic brain temperature critical determine the extent of ischemic neuronal injury.
J Cereb Blood Flow Metab 1987; 7: 729-738
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E
Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.
Neuroscience 1993; 56: 337-344
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E
Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus.
J Neurosci 1995; 15: 4687-4692
- Cameron HA, McKay RD
Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus.
J Comp Neurol 2001; 435: 406-417
- Cohen JJ
Apoptosis
Immunol Today 1993; 14: 126-130
- Conzen P, Hobbhahn J
Sevofluran-Kompodium: Inhalationsanästhetikum
Wiss.Verl.-Abt. Abbott GmbH; Wiesbaden; 2. Auflage 2003: 7-103
- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG
Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain.
Dev Brain Res 2002; 134: 13-21
- Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV
Selective neuronal death after forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study.
Neuroscience 1988; 27: 387-402

Dean JM, Koehler RC, Schleien CL, Michael JR, Chantarojanasiri T, Rogers MC, Traystman RJ

Age-related changes in chest geometry during cardiopulmonary resuscitation.
J Appl Physiol 1987; 62: 2212-2219

DeFazio A, Leary JA, Hedley DW, Tattersall MH
Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo.
J Histochem Cytochem 1987; 35: 571-577

Del Rio JA, Soriano E
Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse.
Dev Brain Res 1989; 49: 311-317

Doi M, Ikeda K
Airway irritation produced by volatile anesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane, and sevoflurane.
Can J Anaesth 1993; 40: 122-126

Drummond JC, Shapiro HM
Cerebral physiology
In: Miller RD (Hrsg.): Anesthesia Volume 1; New York; 3. Auflage 1990: 621-658

Duvernoy HM
The human hippocampus
An atlas of applied anatomy; JF Bergmann Verlag; München 1988: 1-154

Eklöf B, Siesjö BK
The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain.
Acta Physiol Scand 1972; 86: 528-538

Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990
BGBl: 2747

Engelhard K, Bachl M, Eberspächer E, Werner C, Hilt E, Hutzler P, Kochs E
Sevoflurane und Propofol beeinflussen die Expression apoptoseregulierender Proteine nach zerebraler Ischämie der Ratte.
Anästh Intensivmed Notfallmed 2001; 42: 456-462

Engelhard K, Werner C, Hoffman WE, Matthes B, Blobner M, Kochs E
The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats.
Anesth Analg 2003; 97: 1155-1161

Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Pape M, Blobner M, Hutzler P, Kochs E
Sevoflurane and propofol influence the expression of apoptosis regulating proteins after cerebral ischemia and reperfusion in rats.
Europ J Anaesth 2004; 21: 530-537

LITERATURVERZEICHNIS

Engelhard K, Stegemann U, Eberspächer E, Kluge J, Winkler J, Werner C, Kochs E
Influence of the severity of cerebral ischemia on neuroregenerative potency.
In Vorbereitung

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson DA
Neurogenesis in the adult human hippocampus.
Nature Med 1998; 4: 1313-1317

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford; 7 Auflage 1998: 235-246

Frey H.H, Löscher W.(Hrsg)
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart; 1996: 159-160

Ginsberg MD, Busto R
Rodent models of cerebral ischemia.
Stroke 1989; 20: 1627-1642

Goldman SA, Nottebohm F
Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.
Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 2390-2394

Goldsworthy TL, Morgan KT, Popp JA, Butterworth BE
Guidelines for measuring chemically induced cell proliferation in specific rodent target organs.
Prog Clin Biol Res 1991; 369: 253-284

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS
Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus.
J Neurosci 1992; 12: 3642-3650

Gould E
The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival.
Ann NY Acad Sci 1994; 743: 73-92

Gould E, Tanapat P
Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat.
Neuroscience 1997; 80: 427-436

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E
Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.
Proc Natl Acad Sci 1998; 95: 3168-3171

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG
Neurogenesis in the neocortex of adult primates.
Science 1999a; 286: 548-552

- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ
Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation.
Nat Neuroci 1999b; 2: 260-265
- Graham DI, Lantos PL
Greenfield's Neuropathology
Arnold; London; 6. Edition 1997; 86-90
- Gratzner HG
Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyridine: a new reagent for detection of DNA replication.
Science 1982; 218: 474-475
- Grogaard B, Gerdin B, Arfors KE
Forebrain ischemia in the rat. Relation between duration of ischemia, use of adjunctiv ganglion blockade and longterm recovery.
Stroke 1986; 17: 1011-1015
- Gu W, Brannstrom T, Wester P
Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke.
J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20: 1166-1173
- Hees H, Sinowatz F
Histologie
Kurzlehrbuch der Zytologie und makroskopischen Anatomie; Deutscher Ärzteverlag; Köln;
3. Auflage 2000: 353-354
- Hennes HJ (Hrsg):
Anästhesiologische Aspekte der gestörten zerebralen Perfusion
Wiss. Verl.-Ges.; Stuttgart; 1999: 13-52
- Hirota K, Roth SH
The effects of sevoflurane on population spikes in CA1 and dentate gyrus of the rat hippocampus in vitro.
Anesth Analg 1997; 85: 426-430
- Hoffman WE, Braucher E, Pelligrino DA, Thomas C, Albrecht RF, Miletich DJ
Brain laktate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats.
Anesthesiology 1990; 72: 1045-1050
- Hoffman WE, Thomas C, Albrecht RF
The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat.
Anesth Analg 1993; 76: 279-283
- Hsu SM, Raine L, Fanger H
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-580

- Ito U, Spatz M, Walker JT jr, Klatzo I
Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils.
Acta Neuropathol 1975; 32: 209-223
- Jiang W, Gu WG, Brännström T, Rosqvist R, Wester P
Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion.
Stroke 2001; 32: 1201-1207
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA
Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat.
PNAS 2001; 98: 4710-4715
- Kaepfel B
Adulte Neurogenese und deren Beeinflussung durch S-Ketamin.
Vet. Med. Diss.; München, in Vorbereitung
- Kaplan MS, Hinds JW
Neurogenesis in adult rat: electron microscopic analysis of light radiographs.
Science 1977; 197: 1092-1094
- Katoh T, Ikeda K
The minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in humans.
Anesthesiology 1987; 66: 301-303
- Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM
Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat.
Exp Brain Res 2001; 136: 313-320
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM
The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis.
J Neurosc Meth 2002; 115: 97-105
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH
More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.
Nature 1997(a); 386: 493-495
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH
Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.
Proc Natl Acad Sci 1997(b); 94: 10409-10414
- Kempski O
Neuroprotektion: Modelle und Grundprinzipien.
Anaesthesist 1994; 43: 25-33
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br J Cancer 1971; 43: 239-257

- Kitaguchi K, Oshumi H, Kuro M, Nakajima T, Hayashi Y
Effects of sevoflurane on cerebral circulation and metabolism in patients with ischemic cerebrovascular disease.
Anesthesiology 1993; 79: 704-709
- Klug CA, Cheshier S, Weissman IL
Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny.
Blood 2000; 96: 894-901
- Kochs E, Krier C, Buzello W, Adams HA
Anästhesiologie Band 1
Georg Thieme Verlag; Stuttgart; 2001: 176-204
- König HE, Liebig HG
Anatomie der Haussäugetiere
Band 2: Organe, Kreislauf- und Nervensystem; Schattauer Verlag; Stuttgart; München; 1999;
S. 210-211
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.
J Neurosci 1996; 16: 2027-2033
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH
Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.
J Neurosci 1997; 17: 5820-5829
- Langbein T, Sonntag H, Trapp D, Hoffmann A, Malms W, Röth EP, Mörs V, Zellner R
Volatile anaesthetics and the atmosphere: atmospheric lifetimes and atmospheric effects of halothane, enflorane, isoflurane, desflurane, and sevoflurane.
Br J Anaesth 1999; 82: 66-73
- Larsen R
Inhalationsanästhesie
In: R Larsen (Hrsg): Anästhesie
Urban & Fischer Verlag; München; Wien; Baltimore; 7. Auflage.2001: 19-53
- Lerman J, Gregory G, Willis M, Eger EI
Age and solubility of volatile anesthetics in blood.
Anesthesiology 1984; 61: 139-143
- Liebich HG
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere
Schattauer Verlag; Stuttgart; New York; 4. Auflage 2003: 125-128
- Liebmann M
Makroskopische Grundlagen der Neuroanatomie, Blutversorgung des Gehirns
Basiswissen Neuroanatomie; Georg Thieme Verlag; Stuttgart; 1993;: 9-16, 113-117

- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR
Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.
J Neurosci 1998; 18: 7768-7778
- Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schultz DW
Effekt of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain.
J Biol Chem 1964; 249: 18-30
- Ljunggren B, Schultz H, Siesjö BK
Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete
compression ischemia.
Brain Res 1974; 73: 277-289
- Magavi S, Leavitt B, Macklis J
Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice
Nature 2000; 405: 951-955
- Malan TP, Kadota Y, Mata H, Frink EJ, Brown BR
Renal function after sevoflurane or enflurane anesthesia in the Fischer 344 rat.
Anesth Analg 1993; 77: 817-821
- Mattson MP, Cheng B
Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium
homeostasis.
Stroke 1993, 24(Suppl I): 136-140
- Mehmet H, Yue X, Penrice J, Cady E, Wyatt JS, Sarrat C, Squier M, Edwards AD
Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral
hypoxia-ischemia.
Cell Death Differ 1998; 5: 321-329
- Miura Y, Grocott HP, Bart RD, Pearlstein RD, Dexter F, Warner DS
Differential effects of anesthetic agents on outcome from near-complete but not incomplete
global ischemia in the rat.
Anesthesiology 1998; 89: 391-400
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.
Development 1992; 116: 210-211
- Nakashima K, Todd MM, Warner DS,
The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarization. A comparison of
the effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane.
Anesthesiology 1995; 82: 1199-1208
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E
Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Paul Parey Verlag; Berlin; 3. Auflage 1991; S. 74-199

LITERATURVERZEICHNIS

Nemoto EM, Bleyaert AL, Stezoski SW, Moosy J, Rao GR, Safar P
Global brain ischemia: a reproducible monkey model.
Stroke 1977; 8: 558-564

Okuno S, Nakase H, Sakaki T
Comparative study of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) and hematoxylin-eosin staining for quantification of early brain ischemic injury in cats.
Neurol Res 2001; 23: 657-661

Oppenheim RW
Cell death during development of the nervous system.
Annu Rev Neurosci 1991; 14: 453-501

Palmer TD, Ray J, Gage FH
FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain.
Mol Cell Neurosci 1995; 6: 474-486

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH
Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contribute to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.
J Neurosci 1997; 17: 3727-3738

Pasternak G
Monoklonale Antikörpertechnik
In: Ganten A (Hrsg.): Handbuch der molekularen Medizin; Band I; Springer Verlag; Berlin; 1997; 145-173

Peterson DA
Stem cells in brain plasticity and repair
Current Opinion in Pharmacology 2002; 2: 34-42

Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F
Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest.
Neurology 1987; 37: 1281-1286

Phuphanich S, Levin VA
Bioavailability of bromodeoxyuridine in dogs and toxicity in rats.
Cancer Res 1985; 45: 2387-2389

Prelle K
Embryonale Stammzellen-tiermedizinische Grundlagen und wissenschaftliche Perspektiven in der Humanmedizin.
Z Med Ethik 2001; 47: 118-125

Price J, Grove E, Williams B, Hajihosseini M, Iavachev L, McNaughton L, Gotz M
Labelling neural precursor cells with retroviruses.
Gene Ther 1994; Suppl 1: 4-5

Pulsinelli WA, Brierley JB

The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model.
Stroke 1979; 10: 492

Pulsinelli WA

Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics.
Prog Brain Res 1985; 63: S. 29-37

Rondi-Reig L, Lemaigre-Dubreuil Y, Montecot C, Muller D, Martinou JC, Caston J, Mariani J

Transgenic mice with neuronal overexpression of bcl-2 gene present navigation disabilities in a water task.

Neuroscience 2001; 104: 207-215

Rüsse I, Sinowatz F

Lehrbuch der Embryologie der Haustiere; Verlag Paul Parey; Berlin; Hamburg 1991;
S. 247-284

Sano T, Drummond JC, Patel PM, Grafe MG, Watson C, Cole DJ

A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat.

Anesthesiology 1992; 76: 221-228

Scheller MS, Tateishi A, Drummond JC, Zornow MH

The effects of sevoflurane on cerebral blood flow, cerebral metabolic rate for oxygen, intracranial pressure and the electroencephalogram are similar to those of isoflurane in the rabbit.

Anesthesiology 1988; 68: 548-551

Schinstine M, Gage FH

Factors affecting proviral expression in primary cells grafted into the CNS.

Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 1993; 71: 311-323

Schmidt W, Reymann KG

Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia.

Neurosci Lett 2002; 334: 153-156

Schmidt-Kastner R, Robertson GS, Hakim A

Monoclonal antibody to NeuN as specific marker for neurons in immunohistochemical evaluation of global ischemic damage in rat.

J Cereb Blood Flow Metab 1995; 15 (Suppl.1): 230-231

Sharp FR, Liu J, Bernabeu R

Neurogenesis following brain ischemia.

Dev Brain Res 2002; 134: 23-30

Shirane R, Shimizu H, Kameyama M, Weinstein PR

A new method for producing temporary complete cerebral ischemia in rats.

J Cereb Blood Flow Metab 1991; 11: 949-956

Siemkowicz E, Hansen AJ

Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycaemic rats.
Acta Neurol Scand 1978; 58: 1-8

Siesjö BK

Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia.

Part I: Pathophysiology

J Neurosurg 1992; 77: 169-84

Silbernagel S, Despopoulos AA

Zentralnervensystem und Sinnesorgane

Taschenatlas der Physiologie; Georg Thieme Verlag; Stuttgart; 4. Auflage 1991; S. 272-324

Smith ML, Auer RN, Siesjö BK

The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia.

Acta Neuropathol 1984; 64: 319-332

Stanfield BB, Trice JE

Evidence that granule cells generated in the dentata gyrus of adult rats extend axonal projections.

Exp Brain Res 1988; 72: 399-406

Steffey EP

Inhalation Anesthetics.

In: Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (eds.): Lumb and Jones veterinary anesthesia
Williamss & Wilkins; Baltimore; 3. Edition 1996: 297-329

Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N

Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice.

Brain Res 1999; 831: 283-287

Takahashi H, Murata K, Ikeda K

Sevoflurane does not increase intracranial pressure in hyperventilated dogs.

Br J Anaesth 1993; 71: 551-555

Takasawa K, Kitagawa K, Yagita Y, Sasaki T, Tanaka S, Matsushita K, Ohstuki T, Miyata T, Okano H, Hori H, Matsumoto M

Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats.

J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22: 299-307

Tanapat P, Galea LA, Gould E

Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus.

Int J Dev Neurosci 1998 ; 16: 235-239

Targ A, Yasuda N, Eger EI

Solubility of I-653, sevoflurane, isoflurane, and halothane in plastics and rubber composing a conventional anesthetic circuit.

Anesth Analg 1989; 69: 218-225

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Science 1998; 282: 1145-1147

Toner CC, Connolly K, Whelpton R, Bains S, Michael-Titus AT, McLaughlin DR, Stamford JA

Effects of sevoflurane on dopamine, glutamate, and aspartate release in an in vitro model of cerebral ischemia.
Br J Anesth 2001; 86: 550-554

Traystman RJ

Animal models of focal and global cerebral ischemia.
ILAR 2003; 44: 85-95

Trepel M

Neuroanatomie
Urban & Fischer Verlag; München und Jena; 3. Auflage 2004; S. 259-273

Vanicky I, Marsala M, Murar J, Marsala J

Prolonged postischemic hyperventilation reduces acute neuronal damage after 15 min of cardiac arrest in the dog.
Neurosci Lett 1992; 135: 167-170

Van Praag H, Kempermann G, Gage FH

Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus.
Nat Neurosci 1999; 2: 266-270

Vinje ML, Moe Mc, Valo ET, Berg-Johnsen J

The effect of sevoflurane on glutamate release and uptake in rat cerebrocortical presynaptic terminals.
Acta Anaesthesiol Scand 2002; 46: 103-108

Walther C

Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins.
Endeavour 2002; 26: 41-44

Ward JM, Henneman JR, Osipova G, Anisimov VN

Persistence of 5-bromo-2'-deoxyuridine in tissues of rats after exposure in early life.
Toxicology 1991; 70: 345-352

Warner DS, Zhou J, Ramani R, Todd MM

Reversible focal ischemia in the rat: effects of halothane, isoflurane, and methohexital anesthesia.
J Cereb Blood Flow Metab 1991; 11: 794-802

Warner DS, McFarlane C, Todd MM, Ludwig P, McAllister AM

Sevoflurane and Halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat.
Anesthesiology 1993; 79: 985-992

LITERATURVERZEICHNIS

- Werner C, Möllenberg O, Kochs E, Schulte am Esch J
Sevoflurane improves neurologic outcome after incomplete cerebral ischemia in rats.
Br J Anaesth 1995; 75: 756-760
- Werner C
"Milde und moderate Hypothermie in der Anästhesie und Intensivmedizin - Neuroprotektive Ansätze".
Refresher Course; Aktuelles Wissen für den Anästhesisten; Springer-Verlag; Hamburg; 1997: 189-197
- Werner C
Neuroanaesthesie - Neuroprotektion.
Thieme Verlag; Stuttgart; 2000; S. 121-142
- Westhorpe R, Blutstein H
Anaesthetic agents and the ozone layer.
Anaesth Intens Care 1990; 18: 102-109
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG
Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb.
Eur J Neurosci 2002; 16: 1681-1689
- Wise-Faberowski L, Raizada MK, Summers C
Desfluran and sevoflurane attenuate oxygen and glucose deprivation-induced neuronal cell death.
J Neurosurg Anesthesiol 2003; 15: 193-199
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I
NeuN: a useful marker for diagnostic histopathology.
J Histochem Cytochem 1996; 44: 1167-1171
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M
Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus.
Stroke 2001; 32: 1890-1895
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M
Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans.
Stroke 1976; 7: 46-53
- Yasuda N, Lockhart, SH, Eger EI, Weiskopf RB, Liu J, Laster M, Taheri S, Peterson NA
Comparison of kinetics of sevoflurane and isoflurane in humans.
Anesth Analg 1991; 72: 316-324
- Yoshida S, Busto R, Watson BD, Santiso M, Ginsberg MD
Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin E.
J Neurochem 1985; 44: 1593-1601

LITERATURVERZEICHNIS

Yu CW, Woods AL, Levison DA

The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications.

Histochem J 1992; 24: 121-131

Zupanc GK, Horschke I

Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study.

J Comp Neurol 1995; 353: 213-233

8 TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tab. 01.</u>	<u>Physiko-chemische Daten von Sevofluran und Halothan (modifiziert nach CONZEN und HOBBAHN 2003)</u>	17
<u>Tab. 02.</u>	<u>Zeitlicher Ablauf des Gesamtversuchs</u>	25
<u>Tab. 03.</u>	<u>Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz und Hämoglobingehalt</u>	51
<u>Tab. 04.</u>	<u>Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂), pH-Wert und Atemfrequenz</u>	53
<u>Tab. 05.</u>	<u>Blutglukosekonzentration (Glukose)</u>	54
<u>Tab. 06.</u>	<u>Perikranielle Temperatur (T peri)</u>	56
<u>Tab. 07.</u>	<u>Ermittlung des Zellschadens in der CA1-Region</u>	58
<u>Tab. 08.</u>	<u>Ermittlung des Zellschadens in der CA3-Region</u>	60
<u>Tab. 09.</u>	<u>Volumen des Gyrus dentatus</u>	62
<u>Tab. 10.</u>	<u>Gesamtanzahl der vorhandenen BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus nach 28 Tagen</u>	63
<u>Tab. 11.</u>	<u>Gesamtanzahl der neu gebildeten Neuronen im Gyrus dentatus nach 28 Tagen</u>	67

<u>Abb. 01.</u>	<u>Modifizierte schematische Darstellung des Hippokampus und des Gyrus dentatus nach DUVERNOY (1988).</u>	5
<u>Abb. 02.</u>	<u>Formen der zerebralen Ischämie mit Beispielen (modifiziert nach HENNES 1999).</u>	7
<u>Abb. 03.</u>	<u>Schematische Abbildung der Markierung mitotischer Zellen mit 5-Bromo-2-deoxyuridin (modifiziert nach GRATZNER 1982).</u>	13
<u>Abb. 04.</u>	<u>Die zwei Hauptregionen adulter Neurogenese (modifiziert nach BIEBL et al. 2000).</u>	14
<u>Abb. 05.</u>	<u>Chemische Strukturformel von Sevofluran.</u>	18
<u>Abb. 06.</u>	<u>Chemische Formel von Halothan.</u>	22
<u>Abb. 07.</u>	<u>Gruppeneinteilung.</u>	26
<u>Abb. 08.</u>	<u>Unterlegung der <i>Aa. carotides</i> mit Gummibändern.</u>	28
<u>Abb. 09.</u>	<u>Zeitlicher Verlauf der einzelnen Phasen (I-VIII) der Operation in der Übersicht.</u>	31
<u>Abb. 10.</u>	<u>Überblick über Messwerte und Messzeitpunkte während der Operation.</u>	32
<u>Abb. 11.</u>	<u>Schneiden der beiden Gehirnhälften mit dem Schlittenmikrotom.</u>	34
<u>Abb. 12.</u>	<u>Gruppeneinteilung.</u>	49
<u>Abb. 13.</u>	<u>Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) des neuronalen Zellschaden (HE-Index) in der CA1-Region des Hippokampus nach 28 Tagen Überlebenszeit der sieben Versuchsgruppen (n=8).</u>	59
<u>Abb. 14.</u>	<u>Sevofluran 1,4 Vol% BCAO-Gruppe.</u>	61
<u>Abb. 15.</u>	<u>Nativ-Gruppe.</u>	61
<u>Abb. 16.</u>	<u>Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Gesamtzahl an BrdU-positiven Zellen in den sieben Versuchs-Gruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.</u>	64
<u>Abb. 17.</u>	<u>Sevofluran 2,8 Vol% BCAO-Gruppe.</u>	65
<u>Abb. 18.</u>	<u>Nativ-Gruppe.</u>	65
<u>Abb. 19.</u>	<u>Graphische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Gesamtzahl an doppelt markierten Zellen (BrdU- und NeuN-positiver Neuronen) in den sieben Versuchs-Gruppen (n=8) im Gyrus dentatus der Ratte nach 28 Tagen Beobachtungszeitraum.</u>	68
<u>Abb. 20.</u>	<u>Sevofluran 2,8 Vol% BCAO-Gruppe.</u>	69
<u>Abb. 21.</u>	<u>Nativ-Gruppe.</u>	69

10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2-VO	two vessel occlusion
4-VO	four vessel occlusion
A	Adenin
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ATP	Adenosin-Triphosphat
AW	Ausgangswert
BCAO	beidseitige Okklusion der Arteria carotis communi
BO	Bulbus olfactorius
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Cornu ammonis
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CBF	cerebraler Blutfluss
Cc	Corpus callosum
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Erh	Erholung
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast growth factor
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
G	Guanin
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-buttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein
Gluc	Glukose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
³ H	Tritium
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hal	Halothan
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
I.E.	Internationale Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
i.p.	intraperitoneal
Isch	Ischämie
i.v.	intravenösen
K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	molar
M.	Muskulus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentrationen
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MW	Mittelwert
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl untersuchter Individuen
N.	Nervus
N ₂ O	Lachgas
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	neuronal nuclear protein
NiCl ₂	Nickelchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Ø	keine Behandlung
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p	Signifikanz
ppm	parts per million
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffpartialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PFA	Paraformaldehyd
PO ₄	Phosphat
pH	pH-Wert
Rep	Reperfusion
Red-X	Rhodamin
s.c.	subcutan
s.u.	siehe unten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

S-Phase	Synthese-Phase
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Sevo	Sevofluran
SG	Stratum granulosum
SGZ	Subgranuläre Zone
Sog.	So genannt
SM	Stratum moleculare
SPSS	superior performing software
SSC	Natriumcitrat-Lösung
SV	Scheinversuch
SVZ	subventrikuläre Zone
T	Thymidin
T peri	perikranielle Temperatur
Tab.	Tabelle
TBS	Trizma Base Solution
u.a.	unter anderem
V.	Vena
Vol %	Volumenprozent
Vs	versus
Vv.	Venae
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

11 DANKSAGUNG

Danke vielmals!

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl. phys. E. Kochs, Direktor, und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, leitender Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, für die Überlassung des Themas und die stets vorhandene Bereitschaft zur hilfreichen Diskussion.

Der Forschungsgruppe „Neuroprotektion“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, Frau Dr. med. Kristin Engelhard, Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer und Frau Dr. med. vet. Uta Stegemann für ihre geduldige Hilfe und Beratung in allen Belangen rund um diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskripts und für die zwischendurch benötigten Aufmunterungen.

Frau Anne Frye für ihre große Hilfe, ebenso wie den Kolleginnen und Kollegen des Labors Gebäude 522 für die musikalische und menschliche Unterstützung.

Herrn Dr. rer. Nat. P. Hutzler vom Institut für Pathologie in der GSF für die Überlassung des Lasermikroskops und für die ständige Hilfsbereitschaft.

Meiner Mutter und meinem Bruder, deren ständige generelle Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte.

Allen meinen Freunden, die an dieser Stelle nicht genannt werden können, da eine Auflistung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde☺.

Danke vielmals!

12 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

<input type="checkbox"/> Name:	Julia Kluge
<input type="checkbox"/> Geburtsdatum:	15.04.1977
<input type="checkbox"/> Geburtsort:	München
<input type="checkbox"/> Staatsangehörigkeit:	Deutsch
<input type="checkbox"/> Mutter:	Kristina Kluge, Kinderkrankenschwester
<input type="checkbox"/> Geschwister:	Alexander Kluge, Student

Schulbildung:

- 1983-1987: Haimhauser Grundschule in München
- 1987-1996: Oskar-von-Miller-Gymnasium in München
- 1996: Abitur

Ausbildung:

- 1996: Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Kleintierpraxis Dr. Streitferdt in München

Studium:

- 1997-2003: Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 2003: Staatsexamen
- April 2003: Approbation

Dissertation:

- April 2003- Dezember 2004: Dissertation in der Klinik für Anästhesiologie im Klinikum Rechts der Isar, Arbeitsgruppe Neuroprotektion