

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt an der Universitätsmedizin Mainz, Anästhesiologie

(Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. Kristin Engelhard)

**Einfluss von perioperativer Analgesie nach Schädel-Hirn-Trauma und
Subarachnoidalblutung bei der Maus auf sekundäre pathophysiologische Prozesse
sowie Schmerzbelastung der Versuchstiere**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Nadine Nicole Nittel

aus Stuttgart

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 21.07.2012

Für meine Familie und alle die mich unterstützt und an mich geglaubt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
2	Literaturübersicht	- 4 -
2.1	Nervensystem	- 4 -
2.1.1	Anatomische und histologische Grundlagen des Zielorgans Gehirn	- 5 -
2.1.1.1	Gehirn	- 5 -
2.1.1.2	Meningen	- 5 -
2.1.1.3	Cortex.....	- 6 -
2.1.1.4	Hippocampus	- 6 -
2.1.2	Wichtige zelluläre Strukturen des Gehirns und ihre Funktion.....	- 7 -
2.1.3	Blutversorgung des Gehirns	- 8 -
2.2	Schädel-Hirn-Trauma	- 10 -
2.2.1	Klinische Bedeutung des Schädel-Hirn-Traumas	- 10 -
2.2.2	Pathophysiologie und posttraumatische Spätfolgen des Schädel-Hirn-Traumas.....	- 11 -
2.2.3	Tiermodelle zum Schädel-Hirn-Trauma.....	- 12 -
2.2.3.1	Modell der kortikalen Kälteläsion.....	- 12 -
2.2.3.2	Weight-Drop-Tiermodell	- 13 -
2.2.3.3	Fluid-Percussion-Tiermodell.....	- 13 -
2.2.3.4	Controlled-Cortical-Impact-Tiermodell.....	- 14 -
2.3	Subarachnoidalblutung	- 15 -
2.3.1	Klinische Bedeutung der Subarachnoidalblutung	- 15 -
2.3.2	Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung	- 16 -
2.3.3	Tiermodelle zur Subarachnoidalblutung	- 17 -
2.4	Schmerz	- 19 -
2.4.1	Entstehung, Leitung und Wahrnehmung von Schmerzen	- 19 -
2.4.2	Schmerzarten	- 20 -
2.4.3	Schmerzerkennung und -quantifizierung.....	- 21 -
2.4.4	Gründe für eine Schmerzbehandlung beim Versuchstier	- 22 -
2.4.5	Einfluss von Hirndruck auf Schmerzempfinden.....	- 22 -
2.5	Analgetika	- 24 -
2.5.1	Nichtsteroidale Antiphlogistika.....	- 24 -
2.5.1.1	Wirkmechanismen nichtsteroidaler Antiphlogistika	- 24 -
2.5.1.2	Eingesetzte nichtsteroidale Antiphlogistika	- 25 -

2.5.1.2.1	Carprofen	- 25 -
2.5.1.2.2	Meloxicam	- 26 -
2.5.2	Opioide	- 28 -
2.5.2.1	Wirkmechanismen der Opioide	- 28 -
2.5.2.2	Verwendetes Opioid: Buprenorphin (Temgesic®).....	- 28 -
2.6	Hirnödem und Hirnwassergehalt	- 30 -
2.7	Physiologische Parameter: Futteraufnahme und Körpergewicht.....	- 31 -
2.8	Inflammationsmarker	- 32 -
2.8.1	IL-6	- 33 -
2.8.2	COX-2.....	- 34 -
2.8.3	iNOS	- 35 -
2.9	Das „3R-Prinzip“ – Replace, Reduce, Refine	- 36 -
2.10	Ziele der Arbeit.....	- 37 -
3	Material	- 38 -
3.1	Materialauflistung	- 38 -
3.2	Versuchstiere und Genehmigung des Tierversuchs.....	- 45 -
4	Methoden	- 46 -
4.1	Studiendesign	- 47 -
4.1.1	Gruppengrößen und Gruppenbeschreibung.....	- 48 -
4.1.1.1	Buprenorphin-Gruppe mit Operation	- 48 -
4.1.1.2	Carprofen-Gruppe mit Operation.....	- 48 -
4.1.1.3	Meloxicam-Gruppe mit Operation	- 49 -
4.1.1.4	Vehikel-Gruppe mit Operation.....	- 49 -
4.1.1.5	Sham-Gruppen.....	- 49 -
4.1.2	Zeitlicher Versuchsablauf / Studiendesign	- 50 -
4.2	Tierexperimente	- 52 -
4.2.1	Vorbereitungen vor der Operation	- 52 -
4.2.1.1	Haltung und Fütterung der Tiere	- 52 -
4.2.1.2	Medikamentöse Aufbereitung	- 52 -
4.2.2	Operationsdurchführung.....	- 53 -
4.2.2.1	Narkoseeinleitung und Überwachungsparameter	- 53 -
4.2.2.2	Applikation der Medikamente	- 53 -
4.2.2.3	Induktion des Schädel-Hirn-Traumas.....	- 54 -
4.2.2.4	Induktion der Subarachnoidalblutung.....	- 56 -
4.2.3	Tötung und Blutprobenentnahme	- 60 -
4.2.4	Präparation, Entnahme und Zerteilung des Gehirns	- 61 -
4.2.4.1	Controlled-Cortical-Impact-Gehirn.....	- 61 -
4.2.4.2	Subarachnoidalblutungs-Gehirn.....	- 62 -

4.3	Messung des Hirnwassergehalts	- 63 -
4.4	Histologische Färbungen und Morphometrie	- 64 -
4.4.1	Herstellung der Hirnschnitte für die histologischen Färbungen	- 64 -
4.4.2	Färbungen und Auswertungsmethoden der gefärbten Schnitte	- 64 -
4.4.2.1	Nissl-Färbung	- 64 -
4.4.2.2	Bestimmung des Kontusionsareals und Kontusionsvolumens	- 65 -
4.4.2.3	Iba-1-Färbung	- 66 -
4.4.2.4	Bestimmung der Mikrogliazellzahlen	- 66 -
4.4.2.5	IgG-Färbung	- 68 -
4.5	Bestimmung der physiologischen Parameter: Futteraufnahme und tägliches Körpergewicht	- 69 -
4.6	Molekularbiologische Methoden	- 70 -
4.6.1	Ribonukleinsäure-Isolierung	- 70 -
4.6.2	Ribonukleinsäure Konzentrationsbestimmung mittels Photometer	- 71 -
4.6.3	cDNA-Synthese	- 72 -
4.6.4	Polymerasekettenreaktion-Analyse	- 72 -
4.6.5	Quantitative real-time-PCR	- 73 -
4.6.6	Polymerasekettenreaktion Standard-Generierung für die quantitative real-time-PCR	- 74 -
4.7	Statistische Datenauswertung	- 75 -
4.8	Score-Systeme	- 76 -
4.8.1	Neuroscore	- 76 -
4.8.2	Komfortscore	- 79 -
5	Ergebnisse	- 82 -
5.1	Hirnwassergehalt nach CCI-24 h	- 82 -
5.2	Histologie	- 84 -
5.2.1	Kontusionsvolumen fünf Tage nach CCI – Nissl-Färbung	- 84 -
5.2.2	Mikroglia – Iba-1-Färbung	- 85 -
5.3	Physiologische Parameter	- 86 -
5.3.1	Körpergewicht	- 86 -
5.3.2	Futteraufnahme	- 89 -
5.3.3	Blutwerte	- 92 -
5.3.4	Intrakranieller Druck und lokaler zerebraler Blutfluss während Induktion der SAB	- 93 -
5.4	Molekularbiochemische Ergebnisse	- 94 -
5.4.1	Molekularbiochemische Ergebnisse der CCI-24 h-Studie	- 94 -
5.4.1.1	Expression des Inflammationsmarkers IL-6 nach CCI-24 h	- 94 -

5.4.1.2	Expression des Inflammationsmarkers COX-2 nach CCI-24 h	- 96 -
5.4.1.3	Expression des Inflammationsmarkers iNOS nach CCI-24 h.....	- 98 -
5.4.2	Molekularbiochemische Ergebnisse der SAB- 24 h-Studie	- 100 -
5.4.2.1	Expression des Inflammationsmarkers IL-6 nach SAB-24 h.....	- 100 -
5.4.2.2	Expression des Inflammationsmarkers COX-2 nach SAB-24 h	- 101 -
5.4.2.3	Expression des Inflammationsmarkers iNOS nach SAB-24 h.....	- 102 -
5.5	Score-Systeme	- 103 -
5.5.1	Neuroscore	- 103 -
5.5.2	Komfortscore	- 106 -
6	Diskussion	- 109 -
6.1	Diskussion der Ergebnisse	- 109 -
6.1.1	Hirnwassergehalt nach CCI-24 h.....	- 109 -
6.1.2	Histologie.....	- 110 -
6.1.2.1	Kontusionsvolumen – Nissl-Färbung nach CCI-5 d	- 110 -
6.1.2.2	Mikroglia – Iba-1-Färbung nach CCI-5 d.....	- 111 -
6.1.3	Physiologische Parameter.....	- 112 -
6.1.3.1	Körpergewicht	- 112 -
6.1.3.2	Futteraufnahme	- 113 -
6.1.3.3	Blutwerte	- 114 -
6.1.4	Molekularbiochemische Parameter, IL-6, COX-2 und iNOS	- 114 -
6.1.4.1	IL-6	- 114 -
6.1.4.2	COX-2	- 115 -
6.1.4.3	iNOS.....	- 116 -
6.1.5	Score-Systeme	- 117 -
6.1.5.1	Neuroscore.....	- 117 -
6.1.5.2	Komfortscore.....	- 118 -
6.2	Diskussion weiterer ausgewählter Fragestellungen zum Themenbereich Schmerzen und Analgesie beim Versuchstier	- 119 -
6.2.1	Unterschied im Schmerzlevel zwischen Controlled-Cortical-Impact und Subarachnoidalblutung.....	- 119 -
6.2.2	Schmerzdetektionsmethoden beim Versuchstier	- 120 -
6.2.2.1	Systeme zur Schmerzdetektion.....	- 120 -
6.2.2.2	Eignung von Blutparametern zur Schmerzdetektion	- 121 -
6.2.3	Verwendete Analgetika.....	- 122 -
6.2.4	Dosierung und Applikationsintervall der Analgetika	- 123 -
7	Schlussfolgerung	- 124 -
8	Zusammenfassung	- 125 -

9	Summary	- 127 -
10	Abbildungsverzeichnis	- 129 -
11	Tabellenverzeichnis	- 132 -
12	Literaturverzeichnis	- 133 -
13	Danksagung	- 142 -



ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Anova	Analysis of Variance
Aqua dest.	Aqua destillata (gereinigtes Wasser)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bu	operierte Versuchsgruppe, die mit Buprenorphin behandelt wird
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C57Bl/6N	Black 6 N (Mäuserasse)
Ca	operierte Versuchsgruppe, die mit Carprofen behandelt wird
CBF	Cerebral Blood Flow, zerebraler Blutfluss
CCI	Controlled-Cortical-Impact
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
con	contralateral (Abkürzung lediglich in Abbildungen)
COX	Cyclooxygenase
d	Tag/e
DAB	Diaminobenzidin
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
GCS	Glasgow Coma Scale
g	Gramm
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde
h	Stunde/n
HW-Gehalt	Hirnwassergehalt
Hz	Hertz
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICP	intrakranieller Druck (intracranial pressure)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ips	ipsilateral (Abkürzung lediglich in Abbildungen)
KS	Komfortscore
li.	links
M.	Musculus

Mel	operierte Versuchsgruppe, die mit Meloxicam behandelt wird
min	Minuten
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Normal Goat Serum
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NS	Neuroscore
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
OD	optische Dichte
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPIA	Cyclophilin-A
re.	rechts
RNA	Ribonukleinsäure
SAB	Subarachnoidalblutung
s.c.	sub cutan
sec	Sekunden
Sham	scheinoperiert
Sh-Bu	scheinoperierte Versuchsgruppe, die mit Buprenorphin behandelt wird
Sh-Ca	scheinoperierte Versuchsgruppe, die mit Carprofen behandelt wird
Sh-Mel	scheinoperierte Versuchsgruppe, die mit Meloxicam behandelt wird
Sh-NaCl	scheinoperierte Versuchsgruppe, die mit NaCl behandelt wird
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
u.a.	unter anderem
Veh	operierte Versuchsgruppe, die mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt wird
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
δ	delta
κ	kappa
μ	my
μl	Mikroliter
3R	Replace, Reduce, Refine

1 EINLEITUNG

Obwohl die Anwendung von Schmerzmitteln nach schmerzhaften Versuchen an Labornagern langsam zunimmt, ist die Verbreitung der postoperativen Analgesie beim Versuchstier Maus gering (70, 110). Eine Steigerung der Analgetika-Anwendung nach Tierversuchen von 10% (2000-2001) auf 20% (2005-2006) (133) ist aus tiermedizinischer Sicht nicht ausreichend. Nach heutigem Kenntnisstand wäre eine perioperative und nicht lediglich postoperative Analgesie wünschenswert, um auch intraoperative Schmerzen zu mildern. Zudem existieren wenige Studien über den Einfluss von Analgetika auf in der Praxis häufig verwendete Tierversuchsmodelle.

§ 9 des Tierschutzgesetzes fordert, dass jedes Versuchstier einer schmerzlindernden Behandlung unterzogen werden muss, sobald Schmerzen des Tieres nach Abklingen der Betäubung erwartet werden können. Trotz dieses Gebotes erhalten die meisten Versuchstiere keine Schmerzbehandlung. Der Grund dafür ist, dass das Tierschutzgesetz einen Handlungsspielraum belässt, welcher besagt, dass die schmerzlindernde Behandlung unterbleiben kann, wenn der Zweck des Tierversuchs diese nicht zulässt (68).

Um in Zukunft genauere Informationen über die Analgetika-Behandlung bei verschiedenen Tiermodellen zu erhalten, beschäftigt sich diese Arbeit mit zwei Tiermodellen, die die humanen Krankheitsbilder des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) und der Subarachnoidalblutung (SAB) simulieren sowie deren analgetische Behandlung beim Tier. Das SHT wird anhand des CCI-Modells (Controlled-Cortical-Impact) und die SAB anhand des SAB-Perforationsmodells simuliert. Bei beiden Erkrankungen besteht ein großer Forschungsbedarf, welcher meist in Form von Tierversuchen erfolgt und ohne Analgetikagaben durchgeführt wird.

Weil sich das nozizeptive System bei Mensch und Tier ähneln (37), wird davon ausgegangen, dass Tiere – ebenso wie der Mensch – Schmerzen empfinden. Bei beiden Tierversuchsmodellen – sowohl dem SHT- als auch dem SAB-Modell – handelt es sich um Tierversuchsmodelle, die hochgradige Schmerzen bei Mensch und Tier verursachen. Beim Menschen sind hochgradige Kopfschmerzen bei beiden Krankheiten das Leitsymptom; bei der SAB werden die Schmerzen von den Patienten in einigen Phasen sogar als die schlimmsten Kopfschmerzen ihres Lebens beschrieben (93). Diese erwarteten Schmerzen werfen die von Tierschützern und Tierärzten oft beklagte Forderung auf, Versuchstieren bei schweren schmerzhaften operativen Eingriffen perioperativ Analgetika zu verabreichen. Mit der perioperativen analgetischen Therapie kann einer Schmerzsensitivierung entgegen gewirkt werden.

In der Natur zählt die Maus zu den Beutetieren; sie zeigt ihre Schmerzen nur wenig nach außen. Durch dieses Verhalten fällt die Beurteilung über die Schmerzhaftigkeit eines operativen Eingriffes schwer, ist aber nicht unmöglich. Obwohl es anspruchsvoll ist, einen Schmerzgrad bei der Maus zu ermitteln, zeigt sie Verhaltensänderungen, die mit Schmerz assoziiert werden können. Diese Verhaltensänderungen treten nach Analgetika Gaben seltener auf (106) und ermöglichen Rückschlüsse auf eine Linderung der zuvor vorhandenen Schmerzen.

Für Tierversuche wäre es wünschenswert die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten. Dies gestaltet sich einfacher für Versuche, in denen den Tieren keine Schäden zugefügt werden. Es ist jedoch deutlich schwieriger wenn humane Pathologien nachgebildet werden, welche bereits mechanistisch mit Schmerzen einhergehen. Derzeit ist es jedoch auf Grund der geringen Datenlage für Forscher nicht möglich eine adäquate Schmerztherapie in Tierversuchen mit zerebralen Pathologien anzuwenden, da genaue Kenntnisse über die Wirksamkeit einzelner Wirkstoffe nach zerebralen Insulten nicht vorliegen. Ziel diese Studie, ist es die vorhandene Datenlücke zu reduzieren. In dieser Studie wird der Einfluss einer perioperativen Analgesie nach SHT und SAB bei der Maus auf sekundäre pathophysiologische Prozesse sowie Schmerzbelastung der Versuchstiere untersucht. Anhand der Ergebnisse können die Effekte einer Analgetikatherapie auf gemessene Parameter besser abgeschätzt werden, mit dem Ziel den Einsatz von Analgetika im Tierversuch zu steigern. Eine Reduktion des Schmerzleidens der Versuchstiere und das Abschätzen der Chancen und Risiken einer Analgetikatherapie sind für Forscher und Tierärzte von zentraler Bedeutung. Neben dem Forschungsgedanken ist das Ziel bei Tierversuchen die Schmerzen, Leiden und Schäden bei den Versuchstieren so gering wie möglich zu halten. Mit dem 3R-Prinzip (Replace, Reduce, Refine), welches in Kapitel 2.9 erörtert wird, existieren Bestrebungen, die den Tierschutzgedanken in die Forschung integrieren.

Als Parameter zur Beurteilung der Pathophysiologie werden der Hirnwassergehalt (HW-Gehalt), das neurologische Outcome der Mäuse, Inflammationsparameter auf RNA (Ribonukleinsäure)-Ebene, das Kontusionsvolumen und die Mikrogliaaktivierung untersucht, um zu ermitteln, ob die Analgetika Buprenorphin, Carprofen und Meloxicam einen Einfluss auf oben genannte Parameter ausüben. Um die Schmerzbelastung der Versuchstiere beurteilen zu können, werden Körpergewicht, Futteraufnahme und ein sogenannter Komfortscore (KS) ausgewertet.

Der Aufbau dieser Arbeit gliedert sich in folgende Teile: Die Arbeit beginnt mit der Literaturübersicht, in der die Grundlagen des Themas erläutert werden. Auf die Literaturübersicht folgen der Material- und der Methodenteil in dem die verwendeten Materialien und durchgeführten Methoden aufgezählt beziehungsweise (bzw.) beschrieben werden. Abgerundet wird

die Arbeit durch den Ergebnisteil und die darauffolgende Diskussion der Ergebnisse sowie weiteren ausgewählten Fragestellungen zum Themenbereich Schmerzen und Analgesie beim Versuchstier.

2 LITERATURÜBERSICHT

In der Literaturübersicht wird zunächst eine Einführung in die Krankheitsbilder SHT und SAB gegeben. Des Weiteren werden die in den Krankheitsbildern betroffenen anatomischen Strukturen beschrieben und verschiedene Tiermodelle der Krankheitsbilder erläutert. Darauf folgend werden die Begriffe Schmerz und Schmerzentstehung sowie die verwendeten Analgetika zur Schmerzlinderung erläutert. In den Kapiteln 2.6 bis 2.8 werden ferner die pathophysiologischen Parameter sowie die in der Studie ermittelten physiologischen Parameter Futterraufnahme und Körpergewicht der Tiere vorgestellt. Abschließend werden das „3R-Prinzip“ und die Ziele der Arbeit vorgestellt.

2.1 NERVENSYSTEM

Das Nervensystem kann in ein zentrales und peripheres Nervensystem unterteilt werden. Anatomisch betrachtet setzt sich das zentrale Nervensystem (ZNS) aus dem Gehirn (Encephalon) und dem Rückenmark (Medulla spinalis) zusammen. Seine Hauptfunktion ist die koordinierte Aufnahme und Verarbeitung, sowie die Beantwortung von Umweltreizen. Sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark sind aufgebaut aus der grauen Substanz (Substantia grisea) und der weißen Substanz (Substantia alba).

Graue Substanz erhält ihre graurötliche Farbe durch die Zellkörper der Nervenzellen, welche sich in diesem Bereich befinden. Die in das Neuroepithel eingebetteten Nervenzellen haben einen großen Sauerstoffbedarf, dessen Versorgung durch ein dichtes arterielles Gefäßnetz sichergestellt wird. Dieses Gefäßnetz bedingt die leicht rötliche Schattierung des Rückenmark-Querschnitts. In der Mitte des Schmetterling-Querschnittes befindet sich der Zentralkanal (Canalis centralis) (117), welcher von Liquor cerebrospinalis ausgefüllt wird.

Weißer Substanz (Substantia alba) erhält ihre weiße Färbung durch die weißen Myelinscheiden, die sich um die Axone wickeln. Im Bereich des peripheren Nervensystems werden diese Myelinscheiden durch SCHWANN-Zellen gebildet; im ZNS wird das Myelin aus der Oligodendroglia gebildet. Die Myelinscheiden tragen zur schnellen elektrischen Weiterleitung bei, weil sie als elektrische Isolation der Nervenfasern fungieren. Diese isolierende Schicht ist durch sogenannte Ranvier-Schnürringe unterbrochen. Die entstehenden Aktionspotentiale können sich von Schnürring zu Schnürring weiterleiten und sichern damit eine raschere Weitergabe der elektrischen Impulse als es ohne Ranvier-Schnürringe der Fall wäre. Bei dieser Art von Erregungsleitung spricht man von der saltatorischen Erregungsleitung (117).

2.1.1 ANATOMISCHE UND HISTOLOGISCHE GRUNDLAGEN DES ZIELORGANS GEHIRN

Sowohl beim SHT-Tiermodell als auch beim SAB-Tiermodell werden Schädelkalotte, Meningen und die verschiedenen Strukturen des Gehirns beeinträchtigt. In den folgenden Abschnitten werden die anatomischen Strukturen, die für die Tiermodelle von Bedeutung sind, erläutert.

2.1.1.1 Gehirn

Von außen ist das Gehirn von allen Seiten von knöchernen Strukturen umgeben, es liegt in der dadurch entstehenden knöchernen Schädelhöhle (Cavum crani). Diese Höhle wird durch das Kleinhirnzelt (Tentorium cerebelli) in zwei Abschnitte unterteilt (18): In dem rostral gelegenen größeren Bereich liegt das Großhirn; der kleinere – sich kaudal erstreckende Abschnitt – beherbergt das Kleinhirn.

Aus morphologischer, entwicklungsgeschichtlicher und funktioneller Sichtweise wird das Gehirn in fünf Hauptabschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt, die Medulla oblongata (verlängertes Mark), befindet sich kaudal im Bereich des Foramen magnum und schließt an das Rückenmark an. Daran schließen sich rostral die Pons (Brücke), das Mesencephalon (Mittelhirn), das Diencephalon (Zwischenhirn), das Cerebellum (Kleinhirn) und das Telencephalon (Großhirn) an. Im Inneren des Gehirns befindet sich ein Hohlraumssystem, welches mit Liquor cerebrospinalis gefüllt ist.

2.1.1.2 Meningen

Das gesamte ZNS wird von drei übereinander liegenden, aus Bindegewebe bestehenden Hüllen (Meningen) mesodermalen Ursprungs umhüllt. Die äußerste Hülle bildet die Dura mater, eine derbe und feste Membran aus straffem Bindegewebe. Die darauffolgende weiche Hirnhaut (Leptomeninges) besteht aus zwei Schichten: einer außen gelegenen sogenannten Spinnwebhaut (Arachnoidea) und einer an das Gehirn anliegenden zarten Hirnhaut (Pia mater).

2.1.1.3 Cortex

Die Großhirnrinde (Cortex cerebri) der Haussäugetiere und des Menschen weist auf ihrer Oberfläche viele Windungen (Gyri cerebri) und Furchen (Sulci cerebri) auf. Im Gegensatz dazu haben die Maus und andere Kleinsäuger ein lissenzephales Gehirn, welches eine glatte Oberfläche besitzt. Die Vergrößerung der Großhirnrinde beim hochentwickelten Haussäugetier und Menschen und die dadurch entstehenden Gyri und Sulci sind mit der Bildung einer höheren Gehirnleistung entstanden (117). Die Großhirnrinde kann anatomisch in sieben verschiedene Lappen unterteilt werden: Stirn-, Scheitel-, Hinterhaupt-, Schläfen- und Riechlappen, limbischer Lappen und die sogenannte Insel.

2.1.1.4 Hippocampus

Die Hippocampusformation besteht aus Cornu ammonis (Ammonshorn), Gyrus dentatus, Subiculum Gyrus parahippocampalis und entorhinalem Cortex (111).

Im Querschnitt hat der Hippocampus eine bogenartig gekrümmte Form. Diese liegt im Unterhorn des Seitenventrikels (102). Der Hippocampus wird in die Regionen CA-1, CA-2 und CA-3 gegliedert, welche kappenartig vom unteren Ast des Gyrus dentatus umschlossen werden (102). Die Gedächtnisbildung ist eine wichtige Funktion des Hippocampus, der dem limbischen System angehört (148).

2.1.2 WICHTIGE ZELLULÄRE STRUKTUREN DES GEHIRNS UND IHRE FUNKTION

Das Gehirn ist auf zellulärer Ebene aus Neuronen (Ganglienzellen) sowie Gliazellen aufgebaut. Die Hauptaufgabe der Neuronen ist die Weiterleitung von elektrischen Signalen in Form von Aktionspotentialen.

Neben den Neuronen existieren Gliazellen. Diese stellen im Gehirn eine Art Bindegewebe dar und sind für die Funktion des Gehirns unentbehrlich. Die zentralen Gliazellen können in vier verschiedene Gliazelltypen eingeteilt werden: Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia sowie Ependymzellen. Das ZNS besteht zur Hälfte aus diesen Gliazellen; sie machen 90% aller Gehirnzellen aus (148). Die Astrozyten haben eine Stützfunktion im Gehirn, die zur Aufrechterhaltung der Gewebestruktur beiträgt. Bei nervaler Schädigung werden die zerstörten Zellen durch Astrozyten ersetzt: Es entsteht eine sogenannte Glianarbe. Weitere wichtige Aufgaben der Astrozyten sind die Nährstoffweiterleitung vom Blutgefäß zur Nervenzelle, Wiederaufnahme von ausgeschütteten Transmittern und eine Beteiligung an der Immunabwehr des Gehirns (148).

Die Oligodendrozyten bilden Markscheiden um die Nervenzellfortsätze im ZNS, indem sie ihre Fortsätze um die Nervenzellfortsätze schlingen. Ein einzelner Oligodendrozyt kann mit seinen Fortsätzen verschiedene Nervenzellen umschlingen, um eine Markscheide zu bilden (81).

Die Mikrogliazellen haben die Eigenschaft nicht stationär fest zu sitzen, denn sie sind beweglich. Aufgrund der Beweglichkeit der Mikroglia zeigen diese Zellen eine große Formenvielfalt. Ursprünglich sind Mikroglia ins ZNS eingewanderte Makrophagen. Ihre Funktion besteht darin, Überreste von untergegangenen Gewebe zu phagozytieren und abzubauen. Des Weiteren bildet die Mikroglia ein Abwehrzellsystem, das Antigen-Antikörper-Komplexe aufnimmt, beseitigt und Mikroorganismen im ZNS direkt zerstört: Sie ist zugleich „Polizei und Müllabfuhr“ im ZNS (148).

Die Ependymzellen dienen der Abtrennung von Hirngewebe und Liquorräumen. Sie sind für Sekretion sowie Resorption in diesem Bereich wichtig (148).

Das Gehirn selbst ist nicht sensibel innerviert. Schädigungen des Gehirns führen daher nicht primär zu einer Schmerzwahrnehmung. Entzündliche oder schmerzhafte Prozesse, die in der Schädelhöhle ablaufen, können erst durch die sensible Innervierung der Meningen wahrgenommen werden.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine Barriere zwischen Blut und Gehirn: Sie selektiert die vom Blut ins Gehirn übertretenden Stoffe. Der Aufbau der BHS ist dreischichtig: Die erste Schicht der BHS besteht aus dem Kapillarendothel der Blutgefäße, auf diese folgt als zweite Schicht die Basalmembran, die dritte Schicht wird aus Fortsätzen der Astrozyten gebildet.

Durch diese drei Schichten können Stoffe – abhängig von ihrer Größe und Ladung – entweder selektiv penetrieren oder die BHS verhindert den Durchtritt der Stoffe (148). Bei Schädigungen des Gehirns kann die BHS durchlässig werden; penetrierende Stoffe können zu weiterem Schaden führen.

2.1.3 BLUTVERSORGUNG DES GEHIRNS

Die Blutversorgung des Gehirns (vgl. Abbildung (Abb.) 1) erfolgt über die Arteria (A.) carotis interna, die von der A. carotis communis und der A. basilaris gespeist wird. Beide Arterien versorgen den Circulus arteriosus willisii, der als Ringsystem an der Hirnbasis für die Versorgung des Hirns verantwortlich ist. Die A. carotis interna gelangt über den Canalis caroticus in die Schädelhöhle, durchdringt dort die Hirnhäute und verzweigt sich anschließend. Der Circulus arteriosus ist – wie bereits erwähnt – ein Ringsystem. Sein rostraler Teil wird durch die Vereinigung der ipsilateralen A. cerebri rostralis mit der gleichnamigen Arterie der kontralateralen Seite gebildet. Zusammen werden die Gefäße als A. communicans rostralis bezeichnet. Der caudale Teil des Ringsystems besteht aus den beidseitig vorliegenden Arteriae communicans caudales. Durch diese caudale Ringhälfte wird die A. carotis interna mit der A. basilaris verbunden. Der direkten Fortsetzung der A. carotis interna entspricht die A. cerebri media, die den Großteil der lateralen Hemisphärenoberfläche versorgt. Die A. basilaris verläuft tierartig unterschiedlich (117).

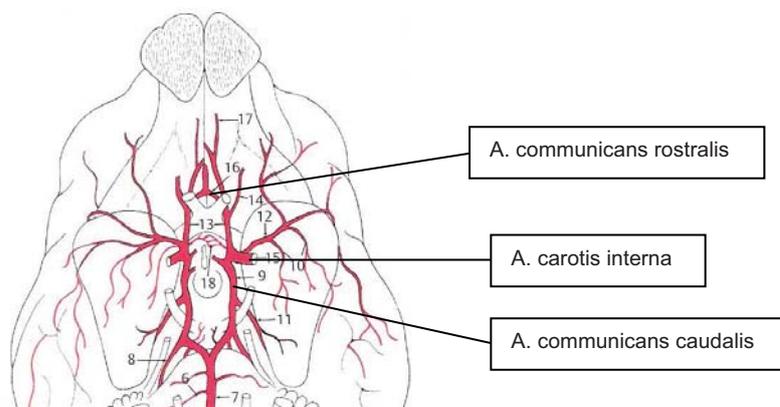


Abbildung 1: Arterielle Blutgefäßversorgung des Gehirns. Modifiziert nach Salomon et al. 2005 (117)

Die größeren Arterien, die in der Oberfläche des Endhirns verlaufen, verzweigen sich in der Tiefe in kleinere Äste und versorgen als feinmaschiges Kapillarnetz alle Schichten des Gehirns (117).

2.2 SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA

Ein SHT wird durch von außen einwirkende Gewalt auf den Kopf eines Lebewesens verursacht. Neben Schäden an Weichteilen und Knochen entsteht eine Schädigung des Hirngewebes. Bis heute gibt es keine zufriedenstellende Therapie nach einem SHT. Die Entstehung einer sekundären posttraumatischen Vergrößerung des Kontusionsvolumens des Gehirns kann bisher medikamentös nicht verhindert werden. Durch das häufige Auftreten des SHT beim Menschen und den dauerhaften Anreiz, die Therapie zu verbessern, hat dieses Forschungsfeld großes Zukunftspotential.

2.2.1 KLINISCHE BEDEUTUNG DES SCHÄDEL-HIRN-TRAUMAS

Die Folgen einer äußeren Gewalteinwirkung auf den Schädel, welche je nach Intensität von einer bloßen Prellung bis zu einer schwerwiegenden Hirnquetschung führen können, werden als SHT bezeichnet (100). Das SHT ist eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität von Kindern (53) und Erwachsenen bis zum 45. Lebensjahr (8). Bei polytraumatisierten Patienten ist das Ausmaß des SHT entscheidend für die Prognose (123). Infolge eines SHT werden viele Patienten in die Notfallambulanz eingeliefert; daran schließt sich eine stationäre Überwachung an (53). Für die Inzidenz des SHT in Deutschland liegen in der Literatur verschiedene Angaben vor. Im Kindesalter wird sie mit 100 - 200 / 100 000 Personenjahre angegeben (27). In der Gesamtbevölkerung belaufen sich die Werte auf 200 - 800 / 100 000 Personenjahre (47, 97, 100).

Alternative Schätzungen gehen davon aus, dass lediglich 50% der Patienten mit SHT in eine Klinik eingewiesen werden (100). Aufgrund der fehlenden Symptomatik suchen Patienten mit einem leichten SHT kein Krankenhaus auf.

Leitsymptome des SHT beim Menschen sind Kopfschmerzen oder ein Bewusstseinsverlust, der durch eine vorübergehende Funktionsstörung des Gehirns infolge der Schädigung des Hirngewebes auftritt.

Zur Einteilung des SHT in Schweregrade wird beim Menschen das Glasgow Coma Scale (GCS) angewendet. Der GCS hat sich international durchgesetzt (155) und wird weltweit verwendet. Es handelt sich um ein Punktesystem, das den Grad der Augenöffnung sowie die Fähigkeit zu verbalen und motorischen Kommunikation des Patienten berücksichtigt. Je nach der Anzahl der Punkte wird das vorliegende SHT als leichtes, mittleres oder schweres SHT klassifiziert.

Schätzungen geben an, dass bei 90,9% der Patienten lediglich ein leichtes SHT, bei knapp 3,9% ein mittleres und bei 5,2% ein schweres SHT festgestellt werden kann (97). Viele Patienten, die ein schweres SHT erleiden, versterben an diesem oder tragen eine dauerhafte Behinderung davon (33). Die Hälfte der aufgrund von SHT behinderten Patienten ist jünger als 25 Jahre (53) und muss einen Großteil ihres zukünftigen Lebens mit körperlichen Behinderungen sowie daraus resultierend sozialen Problemen leben.

2.2.2 PATHOPHYSIOLOGIE UND POSTTRAUMATISCHE SPÄTFOLGEN DES SCHÄDEL-HIRN-TRAUMAS

Der Hirnschaden, welcher beim SHT entsteht, kann in eine primäre und sekundäre Hirnschädigung eingeteilt werden. Der Verlauf des SHT hängt von der Ausprägung der beiden genannten Komponenten ab (156). Die primäre Schädigung entsteht durch beim Schlag auftretende Scherkräfte. Diese bewirken ein Zerreißen von Nervengewebe und Gefäßen (103) und führen dadurch zu einer unmittelbaren Zerstörung von Gehirngewebe. Als Folge resultieren Hypoxie, Hämatome, Ischämie und dadurch entstehende Kontusionsareale. Der primäre Schaden ist nicht reversibel und kann auch nicht therapiert werden, einziger Ansatz für eine Therapie des SHT beim Menschen liegt in einer Reduzierung des sekundären Gehirnschadens.

Im Gegensatz zum primären Schaden entsteht der sekundäre Schaden erst nach Stunden (h), Tagen (d) oder manchmal sogar Wochen (88, 165) (Abb. 2). Eine der wichtigsten Ursachen für die Entstehung des sekundären Hirnschadens stellt die der Verletzung folgende Hirnschwellung dar (115). Diese führt durch den eingeschränkten Platz in der Schädelhöhle zum Druckanstieg im Gehirn; daraus kann ein Abfall des zerebralen Perfusionsdruckes entstehen (22, 165). In der Folge tragen zerebrale Ischämie, Hypoxie und Hypertension zu einem Gewebeuntergang bei. Die Mangelversorgung des Gewebes nach einem SHT ist vergleichbar mit dem einer Ischämie. Diese hat eine Laktatanhäufung und anaerobe Glykolyse im Gewebe sowie die Bildung eines Hirnödems zur Folge (156).

In schweren Fällen eines SHT resultiert ein Hämatom, welches verschiedene Bereiche einbeziehen kann. Neben intrakraniellen Hämatomen, die als Früh- oder Spätkomplikation auftreten können (100), sind Epiduralhämatome, akute Subduralhämatome, chronische Subduralhämatome und intrazerebrale Hämatome zu nennen (100). Die Folge eines Hämatoms und des dazugehörigen kollateralen Ödems ist eine Gehirnkompensation, die durch begrenzte Ausbreitungsmöglichkeit des Gehirns in der Schädelhöhle verursacht wird. Die maximale Ausdehnung des Hirnödems wird in der Regel 24 - 48 h nach Beginn der Hirnschädi-

gung erreicht. Das Hirnödem beim SHT entsteht anlässlich einer primären Minderperfusion, welche eine Permeabilitätsstörung der Hirngefäße (BHS) hervorruft (121).

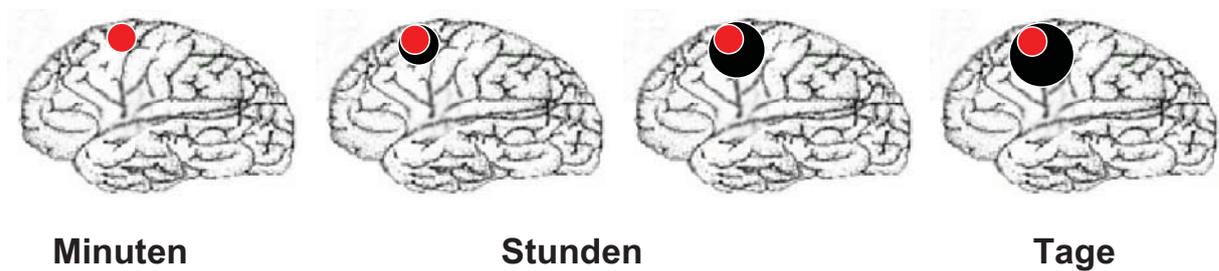


Abbildung 2: Zeitliche Entwicklung des Schadens nach SHT - schematische Darstellung des primären Schadens (roter Punkt), und des sich entwickelnden sekundären Schadens (schwarzer Punkt). Modifiziert nach Dirnagl et al. 1999 (28)

2.2.3 TIERMODELLE ZUM SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA

Das SHT des Menschen ist ein komplexes Krankheitsbild, das in verschiedenen Ausprägungen vorliegen kann. Aus diesem Grund werden einerseits Tiermodelle benötigt, die möglichst viele Parameter des SHT imitieren, andererseits werden Tiermodelle benötigt, die lediglich einzelne Parameter des SHT berücksichtigen, um Therapieansätze für das komplexe Krankheitsbild als auch dessen Teilaspekte weiter zu erforschen.

Der zentrale Forschungsansatz des SHT beim Menschen liegt in der Entwicklung neuer Therapieformen. Ein bedeutender Aspekt ist die Minimierung des sekundär entstehenden Hirnschadens. Die wichtigsten Parameter des SHT, die man mit einem Tiermodell simulieren kann, sind die fokale Kontusion, das Hirnödem, die intrakranielle Blutung, Ischämie und der diffuse Axonschaden (86). Das CCI- und das Fluid-Percussion-Tiermodell sind in der SHT-Forschung häufig eingesetzte Modelle (107). Neben diesen beiden Modellen werden darüber hinaus das Modell der kortikalen Kälteläsion und das Weight-Drop-Tiermodell vorgestellt, welche ebenfalls vielfach publiziert sind.

2.2.3.1 Modell der kortikalen Kälteläsion

Bei diesem Trauma-Modell wird eine Hirnläsion mittels Kälte verursacht. Auf die Oberfläche des freigelegten Cortex wird ein auf -70 °C abgekühlter Kupferstempel mit definierter Größe und Zeit gesetzt (75). Die Kälte führt zum nekrotischen Absterben der Endothelzellen und erzeugt somit einen Schaden im Cortex. Der Schadensbereich ist umrandet von einer Zone mit geschädigten Endothelzellen und einer damit verbundenen gestörten BHS (143). Als

Folge der gestörten BHS entsteht ein vasogenes Hirnödem (86). Vorteile der kortikalen Kälte-läsions-Methode sind einfache Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit. Als nachteilig wird das Fehlen mechanischer Einwirkung – durch einen Schlag oder Ähnliches – auf das Gehirn gesehen, das beim Simulieren eines SHT von großer Bedeutung ist.

2.2.3.2 Weight-Drop-Tiermodell

Das 1981 erstmalig beschriebene Weight-Drop-Tiermodell (40) bedient sich der Schwerkraft eines fallenden Gewichts. Durch den Aufprall dieses Gewichts, das sich in einer am Kopf des Tieres befestigten Plexiglassäule befindet, wird ein Schaden erzeugt. Der Schweregrad des Hirnschadens wird durch die Gewichtsmasse und die Höhe, aus der das Gewicht fallen gelassen wird, bestimmt. Das Modell kann mit oder ohne Kraniotomie vor dem Aufschlag durchgeführt werden (35).

Der Vorteil dieser Methode ist die kurze Durchführungszeit, weil keine aufwändigen Vorbereitungen nötig sind. In der Durchführung des Tierversuchs routinierte Personen benötigen weniger als 30 sec pro Maus (40). Nachteile dieses Modells sind die mangelnde Geschwindigkeitskontrolle des fallenden Gewichts und eine unkontrollierte Eindringtiefe. Aus diesem Grund ist es schwierig, mit dem Weight-Drop-Tiermodell einen reproduzierbaren Schaden hervorzurufen (22).

2.2.3.3 Fluid-Percussion-Tiermodell

Im Fluid-Percussion-Modell wird das SHT mithilfe eines Flüssigkeitsbolus hervorgerufen (3). Zur Durchführung wird eine kreisförmige Kraniotomie der Schädelkalotte durchgeführt. Auf diese kreisförmige Kraniotomie wird ein abgeschnittener Kanülenkonus (gleicher Durchmesser wie Kraniotomie) geklebt, der als Hülse dient um den späteren Flüssigkeitsimpuls weiterzuleiten. Die Hülse wird mit isotonischer Kochsalzlösung aufgefüllt, an diese wird über einen gefüllten Infusionsschlauch ein mit Flüssigkeit gefüllter Zylinder (siehe Abb.3) angeschlossen. Ein Pendel, das aus definierter Höhe fallen gelassen wird, trifft auf den mit Flüssigkeit gefüllten Zylinder (3). Der dadurch entstehende Impuls wird auf den Cortex übertragen und löst dort eine Deformation des Hirngewebes und eine Erhöhung des Hirndrucks aus. Dieses Modell kann ebenfalls bei geschlossenem Schädelknochen durchgeführt werden. Nachteil dieses Modells ist die gering ausgeprägte fokale Kontusion. Da Therapieeffekte meist in der Verringerung des Kontusionsvolumens beurteilt werden, kann ein Therapieeffekt nur schwer nachgewiesen werden (86).

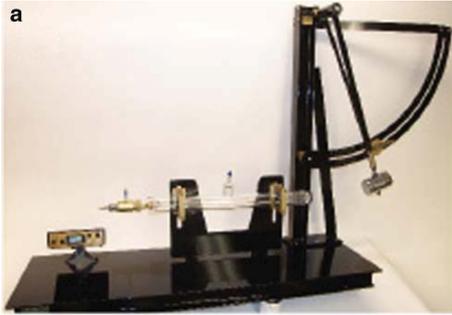


Abbildung 3: Fluid-Percussion-Modell (107)

2.2.3.4 Controlled-Cortical-Impact-Tiermodell

In der vorliegenden Studie wird das an die Maus adaptierte CCI-Tiermodell gewählt, weil es eine gut reproduzierbare Methode darstellt, um ein SHT auszulösen. In dem CCI-Modell wird das SHT mithilfe eines druckluftbetriebenen Bolzens, der in das Gehirngewebe eindringt, hervorgerufen. Vor dem Einschlag erfolgt eine Kraniotomie der Schädelkalotte. Auf die freiliegende intakte Dura wird die Bolzenhülse flach aufgelegt; der Bolzen schlägt mit definierter Geschwindigkeit und Eindringtiefe auf das Gehirn ein. In diesem Modell wird ein fokal begrenzter Parenchymschaden hervorgerufen, der gut steuerbar ist. Das Modell wurde erstmalig 1988 beim Frettchen beschrieben (82). 1991 wurde es für die Ratte (29) und 1995 für die Maus (129) angepasst.

Der Vorteil des Modells ist die Kontrollierbarkeit des Bolzens: Sowohl Bolzendicke, Eindringtiefe, Eindringgeschwindigkeit als auch Aufschlagzeit sind definiert. Durch Steuerung der genannten Parameter löst das CCI-Tiermodell ein gut reproduzierbares SHT aus.

2.3 SUBARACHNOIDALBLUTUNG

Das zweite Tiermodell ist das SAB-Tiermodell. Bei der SAB handelt es sich um eine spontane Einblutung in den Subarachnoidalraum. Als Ursache liegt in der Regel die Ruptur eines Aneurysmas der basalen Hirnarterie im Bereich des Circulus arteriosus willisii vor (91). Das Tierversuchsmodell zur Nachahmung der SAB des Menschen besteht aus einer operativen Perforation des Circulus arteriosus willisii.

2.3.1 KLINISCHE BEDEUTUNG DER SUBARACHNOIDALBLUTUNG

Die Inzidenzrate der SAB beim Menschen liegt in den meisten Industrienationen – aus denen Daten vorliegen, bei 6 -7 / 100.000 Personen pro Jahr. In Japan und Finnland werden sogar Werte von 20 / 100.000 Personen pro Jahr genannt (93). Insgesamt versterben 50% der Betroffenen an dieser Form der intrakraniellen Blutung. 10 - 15% der SAB-Patienten versterben prähospital auf dem Transport in ein Krankenhaus (93). Damit weist das Krankheitsbild der SAB eine hohe Morbidität und Mortalität auf (162). Außerdem ist die nicht traumatische SAB die dritthäufigste Ursache für das Auftreten eines Schlaganfalls (56). Um bessere Früherkennung bzw. Therapiemöglichkeiten der SAB zu finden, stellt das Tiermodell der SAB an der Maus ein wichtiges Instrument zur weiteren Erforschung dieser Erkrankung dar.

Als Hauptsymptomatik zeigen die Patienten mit einer SAB Kopfschmerzen, die von einer Vigilanzstörung begleitet werden, die sich von leichter Somnolenz bis hin zum Koma abstufen lässt. Bei 90% der Betroffenen treten Kopfschmerzen auf, die in 50% der Fälle intensiv und langanhaltend sind. Selbst Monate bis Jahre nach der SAB können die Kopfschmerzen persistieren (99). Die auftretenden Kopfschmerzen erreichen binnen weniger Sekunden (sec) maximale Intensität (90) und sind häufig von noch nie erlebter Intensität (56).

Weitere Symptome sind eine sich entwickelnde Nackensteifigkeit (Meningismus), Übelkeit, Erbrechen und Photophobie.

Auftreten und Stärke der neurologischen Ausfälle hängen von der Blutungsquelle ab und davon, in wie weit das Hirnparenchym betroffen ist. Es können Augenmuskelparesen, andere Paresen, Gesichtsfelddefekte sowie epileptische Anfälle auftreten (90).

Die SAB tritt beim Menschen in 80% der Fälle spontan durch die Ruptur eines sackförmigen Aneurysmas des Circulus arteriosus willisii auf. In Abb. 4, Beschriftung Ziffer 1 ist die häufigste Blutungsstelle der SAB im Blutgefäßsystem gezeigt.

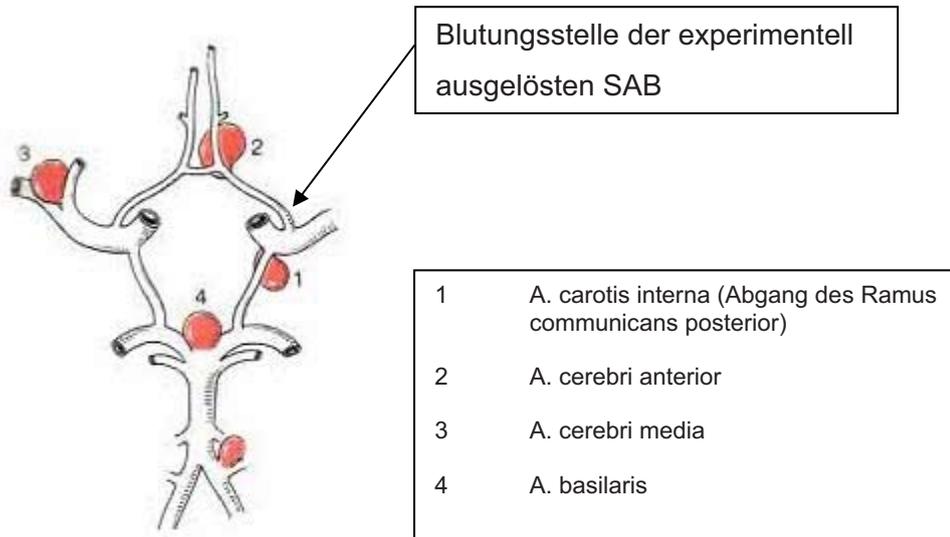


Abbildung 4: Häufigste Lokalisationen von Aneurysmen der basalen Hirnarterien beim Menschen. Modifiziert nach Schumpelick 2006 (122)

Das Aneurysma ist oft angeboren. Intrakranielle Aneurysmen werden bei etwa 2% der Bevölkerung gefunden (121). Die Ursache dieser stecknadelkopf - bis birnengroßen Gefäßaneurysmen ist meistens eine Gefäßwandschwäche; selten ist die Ursache ein gerissenes arteriovenöses Angiom. Als weitere ätiologische Faktoren spielen chronische arterielle Hypertonie, hämorrhagische Diathesen und seltener Neoplasien eine wesentliche Ursache. Auch der Abusus von Kokain kann eine SAB verursachen. Trotz weitreichender Diagnostik hat die SAB bei 10% der Patienten eine idiopathische Genese (90). Aneurysmenblutungen haben unbehandelt eine hohe Mortalität. Das Ziel einer Behandlung ist die möglichst schnelle Ausschaltung der Blutungsquelle. Dies wird auf chirurgischem Weg durch endovaskuläres Coiling oder mikrovaskuläres neurochirurgisches Clipping durchgeführt (101). Präoperativ sind Blutdruckkontrolle, Stabilisierung des Atem- und Kreislaufsystems sowie die Therapie von Schmerz und Unruhe zielgebend (125).

2.3.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER SUBARACHNOIDALBLUTUNG

Der SAB liegen – wie in Kapitel 2.3.1 erläutert – verschiedene Ätiologien zu Grunde. Ein gemeinsames Ereignis dieses Krankheitsbildes ist das Eindringen von Blut in den Subarachnoidalraum. In 80% der Fälle ist eine Aneurysmaruptur Ursache der SAB (124). Aneurysmen kommen bei etwa 2% der erwachsenen Bevölkerung vor. Eine SAB hat die Bildung eines Hirnödems und eine eventuelle Ausdehnung des Subarachnoidalraums zur Folge. Durch den Anstieg des Hirndrucks nach der SAB und dem Abfall des zerebralen Blutflusses (CBF) kommt es zu einer globalen Ischämie und dadurch zu einer Mangelversorgung

des Gewebes. Zusätzlich entstehen Blutgerinnsel und eine akute Hypertonie im Subarachnoidalraum (86).

Des Weiteren entwickelt sich ein Vasospasmus, der zu einer Ischämie führt. Er ist einer der Hauptgründe für die hohe Mortalität nach SAB (84). Die aufgrund der Mangel durchblutung verursachte Unterversorgung des Gehirns wird durch den Vasospasmus zusätzlich verstärkt. Zudem kommt es zu inflammatorischen Prozessen und als Folge sowohl zu apoptotischem als auch nekrotischem Zelluntergang.

2.3.3 TIERMODELLE ZUR SUBARACHNOIDALBLUTUNG

Es existieren verschiedene Modelle, um eine SAB bei der Maus hervorzurufen. Im Allgemeinen können drei verschiedene Techniken unterschieden werden wie die SAB ausgelöst wird. Eine Variante ist die Gefäßpunktion oder Avulsion einer Arterie im Gehirn (Perforationsmodell), eine andere ist die direkte Blutinjektion in den Subarachnoidalraum. In der dritten Variante wird ein Blutgerinnsel um ein Hirngefäß erzeugt (Gerinnselmodell) (77). Im Folgenden werden die einzelnen Modelle beschrieben und Vor- und Nachteile erläutert.

1.) Das Perforationsmodell der Ratte wurde von **Kamii et al.** (69) für die Maus modifiziert. Im Perforationsmodell wird ein Faden intraluminal in die A. carotis interna vorgeschoben. Der Faden perforiert im Bereich ihrer intrakraniellen Bifurcation das Gefäß und löst dadurch eine SAB aus (13). So entsteht eine periarterielle Blutung. In der vorliegenden Studie wird dieses SAB-Tiermodell verwendet, da es dem realen Krankheitsbild sehr nahe kommt. Es gilt als repräsentativ zur Nachahmung der klinischen Situation der SAB (77). Nachteile dieser Methode sind die lange Durchführungszeit der OP, die vom Blutdruck abhängige aus dem Gefäß austretende Blutmenge und die daraus resultierende Variabilität im Anstieg des Hirndruckes. In Untersuchungen von **Feiler et al.** (36), in denen das SAB-Versuchsmodell verwendet wurde, mit einer Überlebenszeit von sieben Tagen, beträgt die Mortalität der Mäuse 30%. Neben Defiziten in Motorik und Verhalten zeigen die Tiere auch einen Gewichtsverlust von 20% ihres Körpergewichts, von dem sie sich wenig erholen. Andere Untersuchungen an Ratten geben Mortalitätsraten von 45 - 50% an (13, 108). Diese hohe Sterblichkeit ist neben dem hohen Zeitaufwand ein weiterer Nachteil dieser Methodik.

2.) Blutinjektionsmodelle können in zwei verschiedene Kategorien unterteilt werden. Es gibt Druckmodelle mit beliebigem Druck und Druck-kontrollierte-Modelle (77). Im Blutinjektionsmodell wird die Schädelkalotte durch ein Bohrloch eröffnet und eine Injektion von Blut entweder direkt in den Subarachnoidalraum oder in die Cisterna magna durchgeführt. Eine Studie von **Matz et al.** (92) beschreibt eine Sterblichkeit von 50% bei der Injektion von 50 µl

hämolyisiertem arteriellen Vollblut in die Cisterna magna. Bei dieser Technik wird die Kanüle durch ein zuvor in die Schädeldecke gebohrtes Loch eingeführt. Ein anderes murines Cisterna magna Blutinjektionsmodell wurde von **Lin et al.** (84) entwickelt. In diesem Modell werden 60 µl autologes Blut injiziert indem die atlantooccipitale Membran im 45 ° Winkel durchstoßen wird. Das Modell von **Lin et al.** (84) weist eine Mortalität von 3,4% auf. Durch dieses Modell werden schwere Vasospasmen ausgelöst. Aufgrund der fehlenden Ruptur eines Gefäßes und der dadurch zustande kommenden Einblutung ist mit diesen beiden Modellen eine Simulation der häufig länger anhaltenden Nachblutungen nach SAB nicht zu erreichen. Eine unkontrollierte Ausbreitung des Blutes ist zudem nachteilig. Vorteil der Modelle ist eine kurze Durchführungszeit.

3.) Das Gerinnselmodell kann an verschiedenen Arterien durchgeführt werden, unter anderem auch an Arterien in der Nähe des Subarachnoidalraums. Die verwendete Arterie wird chirurgisch dargestellt; anschließend wird periarteriell autologes Blut injiziert. Das Blut stammt aus der gleichen Arterie von der anderen Körperseite.

Wie auch im Druck- und Blutinjektionsmodell ist die fehlende Ruptur eines Gefäßes nachteilig für die Übertragung des Krankheitsbildes auf den Menschen. Die kurze Durchführungszeit pro Tier ist ein Vorteil zuletzt genannter Methode.

Die in der Forschung am häufigsten verwendeten Modelle sind das Blutinjektionsmodell und das Perforationsmodell (63, 94). Jedes dieser Modelle hat wie oben beschrieben Vor- und Nachteile. Um sich für ein Tiermodell zu entscheiden, muss im Vorfeld jeder Studie genau abgewogen werden, welche pathophysiologischen Vorgänge untersucht werden sollen.

2.4 SCHMERZ

§ 9 des Tierschutzgesetzes schreibt vor, dass Versuchstieren schmerzlindernde Mittel immer dann zu verabreichen sind, wenn nach einem Eingriff an einem Wirbeltier erhebliche Schmerzen erwartet werden. Eine Ausnahme ist gegeben, wenn dies mit dem Zweck des Tierversuchs nicht zu vereinbaren ist (68).

Aufgrund dieser juristischen Vorgabe sind Definition und Differenzierung von Schmerz und erheblichem Schmerz essentiell für die Anwendung des Tierschutzgesetzes. Die weltweit häufig verwendete Definition für Schmerz stammt von der „International Association for the Study of Pain“. Diese beschreibt Schmerz als eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung verbunden ist. Weiterhin wird angeführt, dass auch bei Nichtvermögen einer verbalen Kommunikation des Individuums, ein Individuum trotzdem Schmerz empfinden kann und ein Anrecht auf eine Schmerztherapie hat (60). Der medizinische Begriff Schmerz wird von psychosozialen Einflüssen wie Stress, Leiden und Schäden eines Individuums abgegrenzt. Diese Abgrenzung des physiologisch-sensorischen Aspektes vom psychosozialen Aspekt schränkt das Verständnis für Schmerz stark ein (5).

Vor allem in der humanmedizinischen Forschung wird durch aktuelle Ergebnisse die enge Beziehung von psychosozialen Einflüssen auf das Schmerzempfinden immer deutlicher. Ob ein Individuum einen Schmerz als erheblich wahrnimmt, ist eine subjektive Empfindung. Vom Untersucher - dem Menschen - kann sowohl die unangenehme sensorische als auch die emotionale Erfahrung nicht vollständig nachvollzogen werden (5). Auf die Maus bezogen muss man davon ausgehen, dass sie neben der postoperativen sensorischen Schmerzkomponente zusätzlich vielen Stressfaktoren im Labor ausgesetzt ist. Neben dem Schmerz durch die Operation (OP) sind Geräusche und Handling im Labor eine zusätzliche Belastung für die Maus.

2.4.1 ENTSTEHUNG, LEITUNG UND WAHRNEHMUNG VON SCHMERZEN

Der Schmerz zählt zu den unangenehmen Empfindungen, die sowohl Mensch als auch Tier wahrnehmen können. Ein pathophysiologischer Schmerz entsteht, wenn auf sensible Endorgane potentiell schädigende Reize wirken. Die Reize können mechanischer, chemischer oder thermischer Natur sein. Der durch den Reiz entstehende Impuls am Endorgan wird hauptsächlich über myelinisierte A-delta-Fasern und unmyelinisierte C-Fasern zum Rücken-

mark weitergeleitet. Die A-delta-Fasern transportieren Impulse schnell und dienen der Weiterleitung des Primärschmerzes. Die C-Fasern übertragen Reize für dumpfe, brennende und schlecht lokalisierbare Schmerzen. Durch eine großflächige Stimulierung von viszerale Nervenendigungen entsteht der viszerale Schmerz (54).

Von der Reizentstehungsstelle ziehen Nerven ins Rückenmark, wo die Nervenstränge auf die kollaterale Seite auf Segmenthöhe ziehen. Über den Tractus spinothalamicus erreichen die nerval übermittelten Informationen zunächst den Thalamus und anschließend den Cortex. Im Cortex liegt die Gehirnregion, in der Schmerzen bewusst wahrgenommen werden. Ein weiterer Faktor in der Schmerzwahrnehmung sind biogene Amine. Bei Vorliegen des biogenen Amins, Substanz P, wird Schmerz intensiviert; durch Ausschüttung von Opioiden wird die Schmerzintensität variiert (91).

2.4.2 SCHMERZARTEN

Schmerzen können in verschiedene Schmerzarten unterteilt werden. Es werden somatische und viszerale Schmerzen unterschieden. Des Weiteren ist zwischen akuten und chronischen Schmerzen zu differenzieren. Als Ursache von viszerale Schmerzen werden Ischämien oder Spasmen der glatten Muskulatur angesehen. Schmerzen können auch in physiologische und pathologische Schmerzen unterteilt werden. Die Entstehung von physiologischem Schmerz ist eine Schutzfunktion des Körpers gegen Hitze, Kälte oder Druck. Die Wahrnehmung des physiologischen Schmerzes leitet eine Schutzreaktion ein, z.B. das schnelle Wegziehen der Hand von der heißen Herdplatte. Physiologische Schmerzen dürfen nicht ausgeschaltet werden, da sie für das Überleben eines Individuums essentiell sind. Im Gegensatz zum physiologischen Schmerz gibt es den pathologischen Schmerz. Diese Art von Schmerz entsteht durch einen entzündlichen oder neuropathischen Prozess (54). Aufgrund einer Gewebeerletzung durch Noxe wie Hitze, Kälte, Hypoxien oder anderweitigen Verletzungen wird eine Entzündung im Körper ausgelöst, die über Mediatoren zu Schmerzen führt. Der pathologische Schmerz ist eine unerwünschte Schmerzform und soll aus diesem Grund durch eine Analgetikatherapie eingedämmt werden. In entzündlichen Prozessen kann es zu einer Schmerzsensitivierung kommen. Es existieren Nozizeptoren, die unter physiologischen Bedingungen nicht erregt werden. Bei Anwesenheit von Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandin E₂ werden diese ebenfalls erregt und es führt zu einer Schmerzsensitivierung (161). Durch die perioperative Behandlung mit NSAIDs kann einer Schmerzsensitivierung entgegen gewirkt werden, was die Schmerzhaftigkeit entzündlicher Prozesse deutlich senkt.

Die Strukturen des Körpers gelten als unterschiedlich schmerzempfindlich. Im Folgenden schließt sich eine kurze Erläuterung der im Tierversuch SAB und CCI beeinträchtigten ana-

tomischen Strukturen und deren Schmerzempfindlichkeit an: Die Haut ist mittelgradig schmerzempfindlich, wohingegen das Periost eine hochgradige Schmerzempfindlichkeit aufweist. Der Knochen selbst ist relativ unsensibel, kann aber durch die Entstehung einer Periostitis oder eines Tumors schmerzempfindlich werden. Das Gehirn gilt als schmerzfrei. Die Meningen, die das Gehirn umrunden und bei der Größenzunahme des Gehirns mitbeeinträchtigt sind, gelten allerdings als besonders empfindlich (54). Die Instrumentierung und die Ligatur von Gefäßen ist eine mittel- bis stark schmerzhaftere Behandlung (5).

2.4.3 SCHMERZERKENNUNG UND -QUANTIFIZIERUNG

„Die angemessene Schmerzerkennung beim Tier ist oft schwierig“ (62). An der von **Jenkins** 1987 erstellten Formulierung hat sich bis heute nicht viel verändert. Die Schmerzquantifizierung beim Tier sowie beim Menschen wird aus subjektiver Sicht getätigt und ist dadurch schwer vergleichbar. Da das nozizeptive System des Tieres dem des Menschen ähnlich ist (37), wird davon ausgegangen, dass ein Tier den gleichen Schmerz wie der Mensch empfindet. Ein für den Menschen schmerzhafter Eingriff ist für Labortiere gleichermaßen schmerzhaft und sollte daher therapiert werden.

Eine geeignete Erkennung und Quantifizierung des Schmerzes ist Voraussetzung für den Einsatz von Analgetika beim Labortier. Nach Beurteilung der Schmerzintensität können Notwendigkeit und Dosierung der Analgetika geschätzt werden. Ein einzelner Parameter, um Schmerz zu quantifizieren, liegt bis heute noch nicht vor.

Um bei Tieren eine gezielte passive Schmerzerkennung durchzuführen, benutzt man meist verschiedene Scoring-Tabellen, in denen bestimmte Verhaltensweisen der Tiere bewertet werden. Eine Änderung und Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere, präoperativ zu postoperativ, sind wichtige Anzeichen zur Bewertung von Schmerzen (80) und ihrer Intensität (5). Obwohl es – besonders bei Mäusen – schwierig ist, einen Schmerzgrad zu ermitteln, existieren Verhaltensänderungen, die mit Schmerz assoziiert werden können (106). Treten die Verhaltensänderungen nicht mehr auf, sind die zuvor vorhandenen Schmerzen nicht mehr präsent.

Nicht nur bei Versuchstieren ist es oft schwierig dem Patienten Schmerzen bzw. deren Intensität äußerlich anzusehen. In der Humanmedizin – besonders bei der Behandlung von Kleinkindern und Säuglingen – tritt dieses Problem auf. Hier behilft man sich mittels Befragung der Eltern, um den Schmerzlevel der Kinder besser abschätzen zu können.

Auch wenn Kleinkinder postoperative Schmerzen nicht verbal kommunikativ ausdrücken können, erhalten diese Kinder Analgesie, wenn davon auszugehen ist, dass sie Schmerzen

spüren. Auch Tiere sollten trotz ihres Nichtvermögens, den Schmerz zu artikulieren eine Analgetikatherapie erhalten.

Blutparameter können ebenfalls Hinweise auf Schmerzen und Stress geben. Bei Haussäugetieren werden häufig Katecholaminlevel, die in Stresssituationen ansteigen, im Blut gemessen um Schmerzen zu quantifizieren. Da der Maus aufgrund ihrer Größe ein eingeschränktes Blutvolumen zur Verfügung steht, sind Bluttests, die ein größeres Blutvolumen oder wiederholte Entnahmen benötigen, bei der Maus nicht möglich.

2.4.4 GRÜNDE FÜR EINE SCHMERZBEHANDLUNG BEIM VERSUCHSTIER

Das deutsche Tierschutzgesetz (68) schreibt die Behandlung von Tieren in Tierversuchen, bei denen Schmerzen zu erwarten sind, mit Schmerzmitteln vor. Es gibt auch ethische, moralische und wissenschaftliche Gründe für eine adäquate Schmerztherapie.

Starke Schmerzen haben pathophysiologische Auswirkungen auf viele Vorgänge im Körper und könnten Versuchsergebnisse unkontrollierbar beeinflussen. Des Weiteren können pathologische Veränderungen, die starke und langanhaltende Schmerzen hervorrufen zum Tod von Tieren führen, die nicht mehr in der Studie berücksichtigt werden können. Ethisch-moralisch muss bei Tierversuchen versucht werden, Versuchstiere nicht über ein notwendiges Maß hinaus zu belasten. Daher muss mit der Gabe von Analgetika auch ein Versterben auf Grund von Nebenwirkungen reduziert werden. Das bedeutet nicht nur Kostenminimierung, sondern auch der Verlust von wertvollen¹ Tieren, die nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, wird verringert.

2.4.5 EINFLUSS VON HIRNDRUCK AUF SCHMERZEMPFINDEN

Eine Veränderung des Hirndrucks führt häufig zu Kopfschmerzen. Die knöcherne Schädelkapsel ist ein abgeschlossenes System, in dem sich das Gehirn, der Liquor und das für die Gehirndurchblutung notwendige Blut befinden. Der Körper hält den Druck in diesem System konstant. Kommt es zu einer Blutung, Schwellung oder anderen Ausdehnung der in der

¹ Es existieren viele Arten von Knock-out Mäusen, die entweder teuer in der Anschaffung oder schwer zu beschaffen sind.

Schädelkapsel befindlichen Strukturen, steigt der Druck an, weil die Schädelkapsel sich beim Erwachsenen nicht ausdehnen kann. Für die Schwellung des Hirns ist neben dem Hirnödem auch ein erhöhter CBF von Bedeutung (16). Der physiologische intrakranielle Druck (ICP) sowohl beim Menschen wie auch der Maus liegt bei 5 - 15 mmHg (121). Unabhängig von der Ursache führt eine Erhöhung des Hirndrucks in fast allen Fällen zum Symptom Kopfschmerz, da die sensibel innervierten Meningen an die Schädelkalotte gepresst werden.

Abhängig von der Stärke des Hirndruckes treten weitere vegetative Symptome wie Erbrechen, Pulsverlangsamung und Blutdrucksteigerung auf (100). Stark zunehmender Druckanstieg führt zur Bewusstlosigkeit. Für das Bewusstsein wichtige Strukturen werden eingeklemmt (121) und sind damit nicht mehr voll funktionsfähig.

2.5 ANALGETIKA

2.5.1 NICHTSTEROIDALE ANTIPHLOGISTIKA

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) sind eine Medikamentengruppe, welche in der Humanmedizin als auch Tiermedizin häufig verwendet wird. Dem gegenübergestellt werden die steroidalen Antiphlogistika, zu denen Cortisol und seine Abkömmlinge zählen.

NSAIDs haben einen entzündungshemmenden und in unterschiedlichem Ausmaß einen fiebersenkenden Effekt. Häufig werden sie auch aufgrund ihrer schmerzlindernden Eigenschaft als Schmerzmittel eingesetzt. Die von NSAIDs induzierte Hemmung der Aggregation von Thrombozyten erweitert ihren therapeutischen Einsatzbereich auf die präventive Antikoagulation beispielsweise bei Herzinfarkttrisikopatienten.

2.5.1.1 Wirkmechanismen nichtsteroidaler Antiphlogistika

Die NSAIDs bewirken eine Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX). Durch die Hemmung der COX wird die Synthese der Prostaglandine gemindert. Im Entzündungsgeschehen spielt Prostaglandin E_2 eine zentrale Rolle. Durch die Anwesenheit von Prostaglandin E_2 wird die Gefäßpermeabilität erhöht, was eine Gewebeschwellung sowie Rötung zur Folge hat (127). Die Anwesenheit von Prostaglandin E_2 führt zudem zu einer Intensivierung von Schmerzen. Die Nozizeptoren werden nicht direkt durch Prostaglandin E_2 erregt, sondern es findet eine Sensibilisierung der Nozizeptoren statt, wodurch andere Mediatoren vermehrt wirken können. Außerdem führt die Aktivierung von Prostaglandin E_2 zur vermehrten Bildung von Natriumkanälen. Diese haben nach Depolarisation eine bedeutende Rolle in der Weiterleitung der nozizeptiven Impulse (43). Eine Hemmung der Prostaglandin E_2 -Synthese durch NSAIDs bewirkt somit im entzündeten Gewebe eine Reduktion sowohl der Gewebeschwellung, der Rötung als auch der Schmerzhaftigkeit (153).

Es können zwei Isoenzyme der COX unterschieden werden, die COX-1 und die COX-2. Aus medizinisch therapeutischer Sicht ist ausschließlich eine Hemmung der COX-2 erwünscht, um die Bildung von entzündungsfördernden Prostaglandinen in hohem Maße zu reduzieren. Durch Gabe von COX-2-Inhibitoren wird die Entzündung und damit der Schmerz vermindert. Da die COX-1 physiologischerweise in hohen Mengen exprimiert wird und für die physiologische Schutzfunktion in verschiedenen Organen wichtig ist, gilt ihre Hemmung als unerwünschte Nebenwirkung der NSAIDs (153). Beispielsweise generiert die COX-1 die Bildung von Prostaglandinen in der Niere und hat somit einen Einfluss auf den Blutfluss der Niere.

Desweiteren hat COX-1 ebenfalls eine zentrale Aufgabe in der Bildung von Prostaglandinen bzw. Thromboxanen im Magen, in Thrombozyten und Endothelzellen (95).

Mit dem Ziel, unerwünschte von erwünschten therapeutischen Effekten zu trennen, wurden spezifische COX-2- Inhibitoren entwickelt: Sie verfügen über eine verbesserte gastrointestinale Verträglichkeit bei guter antiinflammatorischer sowie analgetischer Potenz. Die Annahme, dass die COX-2-Isoform ausschließlich proinflammatorisch induziert wird, wurde allerdings in den letzten Jahren widerlegt (58). Es gibt Belege, dass die COX-2 ebenfalls konstitutiv in verschiedenen Organen (Gehirn, Rückenmark, Niere, Gastrointestinaltrakt) exprimiert wird und dort physiologische Funktionen ausübt (34, 58). Nebenwirkungen von COX-2-Inhibitoren können in Zusammenhang mit der Hemmung der konstitutiv exprimierten COX-2 gesehen werden. Die Hemmung der COX bewirkt eine Reduktion der Bildung von Thromboxan A₂ und Prostacyclin. Beide Stoffe sind an der Thrombozytenaggregation sowie Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation beteiligt (87). Eine sich daraus ergebende Nebenwirkung von COX-2 selektiven NSAIDs ist die Erhöhung des Schlaganfall- und Herzinfarkttrisikos. Diese beruht auf einer prothrombotischen Eigenschaft der COX-2-Inhibitoren. Die Erklärung hierfür ist, dass die Hemmung der COX-2 eine verminderte Bildung von Prostacyclin zur Folge hat. Die Thromboxansynthese, die COX-1 abhängig ist, ist allerdings nicht beeinflusst und es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen Thromboxan mit seiner prothrombotischen Wirkung und Prostacyclin, welches antithrombotisch wirkt (42). Die verwendeten NSAID (Carprofen und Meloxicam) sind jedoch keine selektiven COX-2-Inhibitoren, sondern hemmen ebenfalls COX-1.

2.5.1.2 Eingesetzte nichtsteroidale Antiphlogistika

2.5.1.2.1 Carprofen

Carprofen (Rimadyl® Injektionslösung für Hunde und Katzen, Pfizer, DE) zählt zur Gruppe der Arylpropionsäure-Derivate und ist ein – in der Veterinärmedizin häufig – verwendetes Antiphlogistikum. Carprofen zählt zu den COX-Inhibitoren und bewirkt eine um 1,75-fach stärkere Inhibition der COX-2 als der COX-1 (1). Neben seiner analgetischen Wirkung entfaltet es durch die Hemmung der COX auch antiphlogistische sowie antipyretische Effekte. Carprofen penetriert im entzündeten Gewebe schneller die Gefäßwand als im gesunden (42). Dadurch wird eine höhere Wirkstoffkonzentration im entzündlich veränderten Gewebe erreicht, weswegen Carprofen dort besonders wirksam ist.

Die präoperative Verabreichung von Carprofen wird empfohlen, um eine optimale Wirkung zu einem frühen Zeitpunkt zu erreichen (5). Zudem ist eine schmerzlindernde Wirkung be-

reits beim Erwachen des Tieres aus der Narkose erwünscht. Die Verabreichung von Carprofen wird von der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) und weiteren Studien alle 12 h subcutan (s.c.) empfohlen (5, 12). Bei der C57Bl/6-Maus liegen in der Literatur keine Daten zur Plasma-Eliminations-Halbwertszeit von Carprofen vor. Sie beträgt beim Pferd 20 h, beim Rind 30 – 60 h, beim Hund 5 – 12 h und bei der Katze 8 – 20 h (42, 153). Carprofen wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert und abhängig von der Tierart über Kot (Rind) oder Urin (Pferd) ausgeschieden (153). Die analgetische Wirksamkeit von Carprofen bei Mäusen mit moderaten Schmerzen ist in der Literatur bereits gezeigt (39, 64). Es wird ebenfalls beschrieben, dass Carprofen nach Gehirntrauma neuroprotektiv wirkt (142). Des Weiteren ist eine Verbesserung des neurologischen Outcomes als auch eine Erhöhung der Neurogenese nach Carprofenbehandlung bei Mäusen beschrieben (142). Weiterhin senkt Carprofen in Untersuchungen den HW-Gehalt und reduziert die Schadensgröße nach traumatischer SHT. Carprofen reduziert ebenfalls die Anzahl von Mikroglia und verringert Konzentrationen proinflammatorischer Cytokine (142). In Abb. 5 ist die Strukturformel von Carprofen dargestellt:

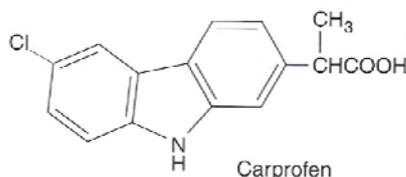


Abbildung 5: Strukturformel von Carprofen (42)

2.5.1.2.2 Meloxicam

Meloxicam (Metacam®-Injektionslösung für Hunde und Katzen, Boehringer Ingelheim, DE) ist ebenfalls ein NSAID. Es zählt zu der Gruppe der Oxicame. Meloxicam hat eine analgetische, antipyretische, antiphlogistische und antiexsudative Wirkung; zudem hemmt es präferentiell die COX-2 (42). Die höchste Gewebekonzentration nach Gabe von Meloxicam liegt bei Ratten und Hunden in der Leber und den Nieren vor, mittlere Konzentrationen können in der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe nachgewiesen werden, im Nervengewebe sind lediglich geringe Gewebekonzentrationen nachweisbar (20). Da Meloxicam wie auch Carprofen seine Wirkung am stärksten bei präoperativer Verabreichung entfaltet, wird von der GV-Solas eine präoperative Anwendung des Analgetikums mit einem Behandlungsintervall von 24 h empfohlen (5). Die Plasma-Eliminations-Halbwertszeit bei C57Bl/6-Mäusen ist nicht bekannt. Bei Albino-Mäusen wird nach intravenöser Applikation mit 6,4 h, bei oraler

Verabreichung mit 4,8 h angegeben (20). Bei anderen Spezies ist die Plasma-Eliminations-Halbwertszeit z.B. beim Pferd mit 2 – 3 h, beim Hund mit 20 – 30 h und bei der Katze mit 11 – 21 h angegeben (154). Die Ausscheidung erfolgt zu 75% mit dem Kot und zu 25% renal (42) Die gute postoperative analgetische Wirksamkeit von Meloxicam bei Mäusen wurde in zwei Untersuchungen beschrieben (149, 158). In folgender Abb. 6 ist die Strukturformel von Meloxicam dargestellt:

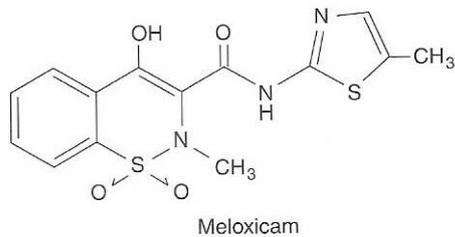


Abbildung 6: Strukturformel von Meloxicam (42)

2.5.2 OPIOIDE

Unter dem Begriff Opioide wird eine chemisch heterogene Gruppe zusammengefasst, die sowohl natürliche als auch synthetische Substanzen beinhaltet, die an sogenannten Opioidrezeptoren wirken und morphinartige Eigenschaften aufweisen (55). In der Humanmedizin werden Opioide häufig eingesetzt, um starke und chronische Schmerzen bei Patienten zu lindern. Auch in der Tiermedizin sind Opioide weit verbreitet. Da viele von ihnen allerdings dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen, werden häufig aus Gründen der Praktikabilität andere Schmerzmittel bevorzugt.

2.5.2.1 Wirkmechanismen der Opioide

Opioide wirken an Opioid-Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind. Ihre Wirkung erfolgt über eine rezeptorvermittelte Öffnung der Kaliumkanäle. Der Kaliumeinstrom unterdrückt die neuronale Weiterleitung des Schmerzreizes. Im ZNS liegen die Opioidrezeptoren an den Schaltstellen, die für die Schmerzverarbeitung verantwortlich sind. Die Opioidrezeptoren können in drei verschiedene Typen eingeteilt werden: μ -, δ - und κ -Rezeptoren. Die zwei bedeutendsten werden im Folgenden erläutert. Der μ -Rezeptor ist nach bisherigem Wissensstand der relevanteste Rezeptor für die analgetische Wirkung von Opioiden. Der κ -Rezeptor verursacht eine Sedierung, die oft durch Opioide herbeigeführt wird (55). An den κ -Rezeptoren wirken sowohl endogene Endorphine als auch pharmakologisch angewandte Opioide.

2.5.2.2 Verwendetes Opioid: Buprenorphin (Temgesic®)

Buprenorphin (Strukturformel siehe Abb. 7) bewährt sich seit den 70 er Jahren (152) durch seine gute analgetische Wirkung und lange Plasma-Eliminations-Halbwertszeit in der Humanmedizin (38). Es ist das am häufigsten in der Versuchstierkunde eingesetzte Schmerzmittel (133), weil es laut derzeitigem Forschungsstand sehr potent bei verschiedenen Schmerzarten ist (114, 133). Buprenorphin ist ein halbsynthetisches Opioid und weist eine gute parenterale Bioverfügbarkeit auf. Seine Wirkpotenz liegt 50 - 100 mal höher als die von Morphin (42). Es ist ein gemischter Agonist-Antagonist und entfaltet seine Wirkung durch Bindung an μ - und κ -Rezeptoren. Beim Menschen besitzt Buprenorphin einen verzögerten Wirkungseintritt. Die maximale Wirkung beim Mensch wird erst 3 h nach Verabreichung erreicht. Die Verzögerung kommt durch die langsame Bindung von Buprenorphin an den μ -Rezeptor zu Stande (113). Bei Hund und Katze wird der Wirkungseintritt von Buprenorphin

nach 30 min beschrieben (11). Die Wirkdauer von Buprenorphin beträgt beim Menschen 6 - 8 h. Es ist in der Lage die BHS zu durchdringen und kann somit in allen Gehirnabschnitten nachgewiesen werden (76). Das von der GV-Solas empfohlene Verabreichungsintervall zur Analgesie beim Versuchstier beträgt 12 h (5). Metabolisiert wird Buprenorphin hauptsächlich in der Leber zu weniger wirksamen Metaboliten, welche über die Galle ausgeschieden werden (113). Buprenorphin wird in vielen Tierversuchen eingesetzt (2, 51, 149) und auf seine analgetische Wirksamkeit in Tierversuchen untersucht. Als Nebenwirkungen sind reduzierte Futter- und Wasseraufnahme sowie Hyperaktivität und Hyperthermie beschrieben (15, 51). In hohen Dosierungen wirkt Buprenorphin sedativ (11).

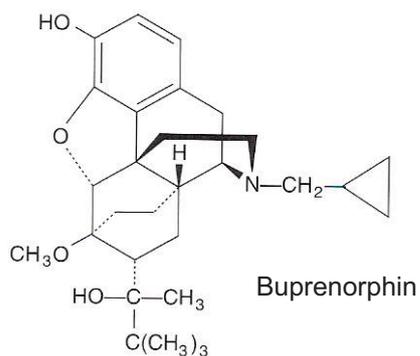


Abbildung 7: Strukturformel von Buprenorphin (42)

2.6 HIRNÖDEM UND HIRNWASSERGEHALT

Ein Hirnödem ist eine diffuse oder lokalisierte Zunahme der Flüssigkeit im Hirngewebe (46). Es ist an fast allen intrakraniellen pathophysiologischen Prozessen beteiligt (19), wie z.B. SHT, Ischämie, Hirntumoren, Meningitis, Enzephalitiden und Hypoxie. Die Ausprägung des Hirnödems hat eine hohe prognostische Bedeutung. Pathophysiologisch können zwei Hauptmechanismen unterschieden werden. Es kann eine vasogene von einer zytotoxischen Hirnödems-Bildung unterschieden werden. Das vasogene Hirnödem entsteht aufgrund der traumatischen Schädigung des Gehirns und einem dadurch entstehenden Defekt der BHS. Dieser Defekt bedingt eine erhöhte Permeabilität der BHS und es kann Flüssigkeit aus den Gefäßen austreten und in das Hirngewebe eindringen. Die Flüssigkeit dringt in perivaskuläre und perizelluläre Räume ein und erweitert diese. Die Astrozyten nehmen die Flüssigkeit auf und schwellen dadurch an (19). Die andere Form des Hirnödems ist das zytotoxische Hirnödem. Durch die Beschädigung der Zellen kommt es zu einem Versagen der Natriumpumpen. Die Retention von Natrium in der Zelle führt zu einem Wassereinstrom (46). In der Regel liegt bei den meisten zerebralen pathophysiologischen Veränderungen eine Mischform von zytotoxischem und vasogenem Hirnödem vor. Beide Formen führen zu einer Schwellung des Hirngewebes. Aufgrund des beschränkten Platzangebotes in der Schädelhöhle führt dies zu einer Erhöhung des Hirndruckes. In der Konsequenz kommt es zu einer reduzierten zerebralen Durchblutung, die eine Ischämie begünstigt (67). Ein vorhandenes Hirnödem erzeugt ein weiteres Hirnödem (46) und trägt dadurch zur Vergrößerung des beeinträchtigten Hirnabschnittes bei.

Obwohl viele Faktoren dazu beitragen, dass sowohl Mortalität als auch Morbidität nach einem SHT hoch sind, ist die Entwicklung eines zerebralen Ödems und die damit entstehende Gehirnschwellung entscheidend für bei dem Menschen auftretende Folgen (30). Ein bedeutender Therapieansatz und Forschungsaspekt in der Behandlung des SHT liegt in der Reduzierung der Entstehung eines Hirnödems, um der dadurch entstehenden Vergrößerung des Schadens vorzubeugen. Die Ausprägung des Hirnödems in der jeweiligen Hemisphäre kann bei der Maus post mortem mit Hilfe des HW-Gehalts-Messung quantifiziert werden (151). Die Wet-Dry-Methode ist eine Standardmethode zur Erfassung des HW-Gehalts nach SHT und ist ein häufig beschriebenes Verfahren in der Literatur (74, 147, 165).

2.7 PHYSIOLOGISCHE PARAMETER: FUTTERAUFNAHME UND KÖRPERGEWICHT

Weil eine Schmerzquantifizierung sich – vor allem bei Tieren – als schwierig erweist, sind Körpergewicht und Futteraufnahme wichtige physiologische Parameter, um das Wohlbefinden der Tiere einschätzen zu können. Weiterhin zeigen Untersuchungen, dass sowohl Körpergewicht als auch Futteraufnahme geeignete Parameter zu Ermittlung der Effizienz einer Analgetikatherapie sind (83).

Das Futteraufnahmeverhalten ist der aussagekräftigste Parameter, wenn es darum geht zu beurteilen, ob sich das Tier wohl fühlt oder Schmerzen hat. Bei akuten Schmerzen ist die Futteraufnahme hochgradig reduziert oder setzt vollständig aus. Eine gesunde Maus mit einem Körpergewicht von 20 - 25 g (Gramm) frisst täglich ca. 3 - 4 g der Futterpellets (ssniff, Soest, DE).

Die Körpergewichtsreduktion nach schmerzhaften Eingriffen ist hauptsächlich auf zwei Gründe zurückzuführen: Einerseits reduziert die Maus wegen der Schmerzen selbst ihren Appetit und damit die Futteraufnahme, andererseits erhöht sich ihr Stoffwechsel – beides hat eine Körpergewichtsreduktion zur Folge.

2.8 INFLAMMATIONSMARKER

Stunden bis Tage nach SHT und SAB entsteht eine lokale und systemische Entzündungsreaktion, die durch endogene Mediatoren bewirkt wird (98) und eine Immunantwort des Gehirns in den beeinträchtigten Gehirnabschnitten zur Folge hat. Mikroglia sind die Gewebemakrophagen des ZNS. Sie schützen das ZNS durch Phagozytose von Zelltrümmern und toxischen Substanzen. Mikroglia, primäre Mediatoren des zerebralen Immunsystems, sind wesentlich an der Immunantwort des Gehirns beteiligt. Sie beeinflussen sowohl die Schadensentstehung als auch die Regeneration des Gehirns, durch die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Prostaglandinen, reaktiver nitrogener Spezies und von Sauerstoffradikalen (85).

Einige dieser Mediatoren und Radikale erhöhen die zerebrovaskuläre Permeabilität (41) und können damit zu einer Hirnödementwicklung nach zerebralen Insulten, wie z.B. nach SHT, ischämischem und hämorrhagischem Schlaganfall oder zerebralen Tumoren, führen (41). In dieser Arbeit werden der Einfluss einer Analgetikagabe nach SHT und SAB auf die Aktivierung von Mikroglia sowie die Liberation der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-6, COX-2 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) untersucht. Diese Parameter werden für vorliegende Studie gewählt, da sie zentrale Marker der Inflammation nach experimentell ausgelöstem SHT darstellen. Sie werden außerdem betrachtet, da in vorherigen Arbeiten (138) gezeigt werden konnte, dass diese Entzündungsmarker stark nach Trauma exprimiert werden. Eine Modulation der Inflammation mit Verringerung der Expression, korrelierte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit einem signifikant verringertem Schaden (138, 145). Die Expression von IL-6 steigt drei Stunden nach Trauma 4000-fach an, nach sechs Stunden liegt der Wert bei dem 13000-fachen (138). Die Expression von iNOS steigt ebenfalls an (135), in einer Arbeit von **Thal et al.** (138) um das 300-fache. Ebenfalls nach SAB ist in der Literatur ein Anstieg der COX-2 und iNOS Expression beschrieben (7, 157). In Abb.8 werden neuroprotektive und neurotoxische Effekte, die durch Mikroglia ausgelöst werden, graphisch dargestellt:

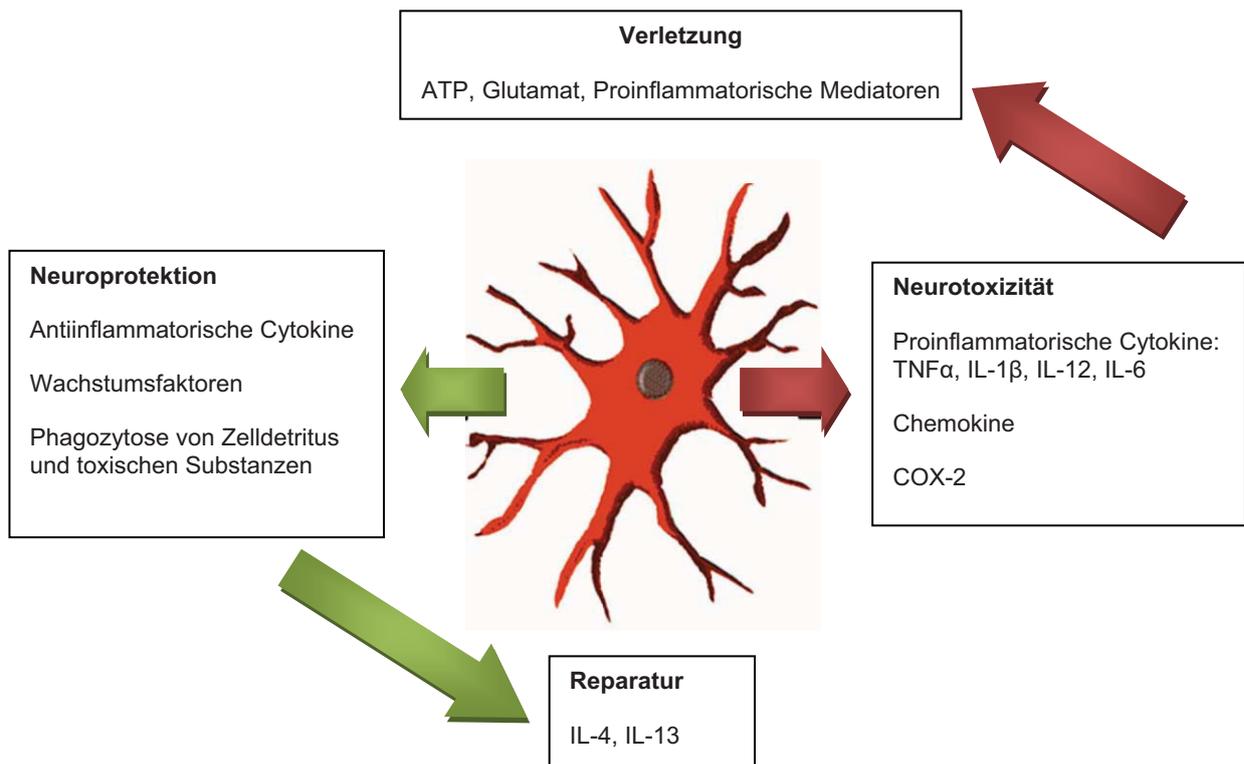


Abbildung 8: Mikroglia und ihre Effekte. Modifiziert nach Loane et al. 2010 (85)

2.8.1 IL-6

IL-6 gehört in die Familie der Interleukine und zählt zu den körpereigenen Botenstoffen. Neben Makrohagen sind Endothel- und Epithelzellen in der Lage IL-6 zu bilden. Seine Hauptfunktion ist die proinflammatorische Aufgabe im Entzündungsgeschehen. Durch die in ein Entzündungsgebiet eingewanderten neutrophilen Granulozyten steigt die Konzentration von IL-6 im entzündlichen und umgebenen Gewebe. Durch diesen Anstieg werden Lymphozyten angelockt und eine weitere Einwanderung von neutrophilen Granulozyten begrenzt. IL-6 spielt zudem eine Rolle in der Umwandlung von Monozyten zu Makrophagen (65)

IL-6 ist ein sensibler Parameter in der Diagnostik von Entzündungen, da es bei Auftreten einer Entzündung im Gewebe sofort ansteigt (14). Wegen der geringen Halbwertszeit von IL-6 im Blutserum von lediglich wenigen Minuten ist es zur Diagnose von akuter Sepsis bedeutsam in der Intensivmedizin. Der Anstieg von IL-6 ist proportional zum Schweregrad der Entzündung (31) und gibt Aufschluss über die Ausprägung einer Entzündung. In anderen Untersuchungen wird beschrieben, dass IL-6 antiinflammatorische Eigenschaften aufweist (144).

Des Weiteren spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der Regeneration von Leberschäden und neuronalen Schäden sowie in der Blutbildung und Fruchtbarkeit.

2.8.2 COX-2

COX sind Enzyme, die die Synthese von Prostaglandinen, Thromboxanen und Eicosapentaensäure katalysieren. Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Schmerzvermittlung während Thromboxane in der Blutgerinnung ihre Wirkung entfalten. Die Hemmung der COX bewirkt eine Reduzierung von Entzündung, Schmerz und Fieber. Die Wirkung einer Langzeithemmung der COX macht man sich zudem in der Vorbeugung von Thrombosebildung, Dickdarmtumoren und der Alzheimertherapie zu Nutzen (130). Bis vor einigen Jahren kannte man zwei Isoformen der COX, die COX-1 und die COX-2. Beide katalysieren die COX-Reaktion in der zuerst zwei Sauerstoffradikale an die Arachidonsäure angelagert werden. Von dem entstandenen Prostaglandin G_2 werden darauffolgend zwei Elektronen in der Peroxidasereaktion abgetrennt. Es bildet sich Prostaglandin H_2 (130).

Der Unterschied zwischen der COX-1 und der COX-2 liegt vor allem in ihrer Gewebeverteilung und in der Regulation ihrer Bildung. COX-1 wird konstitutiv im Gewebe exprimiert. Auffinden kann man COX-1 vor allem in Thrombozyten, Endothelzellen, Nierenrinde, Nierenmark und Gehirn. In der Niere katalysiert die COX-1 die physiologische Bildung von Prostacyclin, welches eine Steigerung der Nierendurchblutung zur Folge hat.

Die COX-2 wird bei der Prostaglandinsynthese von Entzündungsreaktionen induziert. Die COX-2 kann in Makrophagen, Endothel proliferierender Endothelzellen, Niere, Gehirn, Rückenmark und in einigen Arten von Tumorzellen gefunden werden. In der Niere katalysiert die COX-2 die Bildung von Prostacyclinen, welche notwendig sind für die Bildung von Renin. Somit ist die COX-2 für die physiologische Nierenfunktion notwendig (44). Im Gehirn wird die COX-2 bei Entzündungen vermehrt induziert. Es katalysiert eine Reaktion die Prostaglandin E_2 synthetisiert, welches fieberinduzierend wirkt. Im Jahre 2005 wurde eine dritte Isoform der COX gefunden. Sie hat sich durch die Abspaltung eines Introns aus der COX-1 gebildet und wurde als COX-3 bezeichnet. Die COX-3 mRNA wurde in caninem und menschlichem zerebralen Cortex und in Niere, Herz und neuronalem Gewebe von Nagern nachgewiesen (57).

2.8.3 iNOS

Die iNOS ist neben der neuronalen NOS (nNOS) und der endothelialen NOS (eNOS) eine der drei Isoformen von NOS. Die nNOS und eNOS werden in niedriger Menge im Gewebe konstitutiv exprimiert (22). Die eNOS sitzt in den Endothelzellen der Gefäße. In den Endothelzellen wird durch eNOS die Aminosäure L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und L-Citrullin oxidiert. Die Bildung von Stickstoffmonoxid wird angeregt durch den Eintritt von Ca^{2+} in die Endothelzelle, Hypoxie, pH-Änderung und durch eine erhöhte Beanspruchung der Gefäße auf Grund von Scherkräften. Die Stoffe Acetylcholin, Bradykinin und Adenosintriphosphat regen ebenfalls die Bildung von Stickstoffmonoxid an. Das gebildete Stickstoffmonoxid führt zu einer Erschlaffung des Gefäßes und dadurch zu einer Reduzierung des Gefäßtonus. Bei Säugern und Vertebraten wird auf diese Weise der Blutdruck und Blutstrom reguliert (109). Die nNOS kommt im Gehirn vor und ist ein Neurotransmitter.

Die iNOS wird hauptsächlich von Makrophagen exprimiert. Die Exprimierung von iNOS wird durch immunstimulatorische Moleküle induziert. Zu diesen zählen Bakterienendotoxine und proinflammatorische Cytokine. Die bedeutsamsten sind Tumornekrosefaktor α , IL-1 β und Makrophagen. Die Makrophagen können mit Hilfe von der iNOS Bakterien abtöten. Die iNOS ist dadurch Teil eines grundlegenden Instruments der Immunabwehr. In ruhenden Zellen kann die iNOS nicht nachgewiesen werden, sondern lediglich im entzündlich veränderten Gewebe (4).

2.9 DAS „3R-PRINZIP“ – REPLACE, REDUCE, REFINE

Ziel der Wissenschaft sollte das Prinzip der „3R“ – Replacement, Reduction, Refinement – sein, das schon 1959 von **Russel** und **Burch** (116) publiziert wurde. Bei vielen wissenschaftlichen Fragestellungen ist das Replacement-Prinzip, welches den Ersatz von Tierversuchen durch Methoden ohne Tierversuche fordert, kaum ausreichend erfolgreich. Durch die Komplexität von Krankheitsbildern können viele Symptomkombinationen nur anhand von Tiermodellen nachgestellt und erforscht werden. Wenn Tiermodelle für die wissenschaftliche Forschung unabdingbar sind, sollte das Reducement-Prinzip, das eine Verringerung der Tierzahlen vorgibt, eingesetzt werden. Diesem Prinzip sind dadurch Grenzen gesetzt, dass eine Mindesttierzahl pro Versuchsgruppe nötig ist, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu ermitteln. Der letzte Punkt des „3R-Prinzips“ ist das Refinement, das den Versuch darstellt, Tierversuche weiterzuentwickeln und in Tierversuchen die Belastung der Tiere zu minimieren. Die Analgetikatherapie in Tierversuchen ist eine gute Form, um die Belastung der Tiere zu verringern und dadurch das Refinement-Prinzip anzuwenden.

2.10 ZIELE DER ARBEIT

In dieser Arbeit soll der Einfluss von perioperativer Analgesie auf die gemessenen Parameter beurteilt werden. Folgende Fragestellungen sollen geklärt werden:

- 1.) Wird der HW-Gehalt durch die analgetische Therapie mit Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam zum Zeitpunkt 24 Stunden post Trauma beeinflusst?
- 2.) Führt die Gabe von Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam zu einer Veränderung des histologischen Kontusionsvolumens 24 Stunden post Trauma?
- 3.) Findet eine Beeinflussung der Aktivierung der Mikroglia im Gehirn nach SHT zum Zeitpunkt 24 Stunden post Trauma durch die Therapie mit Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam statt?
- 4.) Werden durch die Therapie mit Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam das Körpergewicht, die Futteraufnahme und die Blutwerte nach SHT oder SAB beeinflusst?
- 5.) Wird durch die Gabe von Analgetika die posttraumatische Expression der Inflammationsparameter IL-6, COX-2 oder iNOS 24 Stunden posttraumatisch beeinflusst?
- 6.) Verändert sich die Neurologie der Mäuse nach SHT oder SAB posttraumatisch auf Grund von der Therapie mit Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam?
- 7.) Verändert die Gabe von Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam das Wohlbefinden und das Schmerzniveau der Versuchstiere am ersten, dritten und fünften posttraumatischen Studientag?

3 MATERIAL

Im ersten Teil des folgenden Abschnitts erfolgt eine Materialauflistung der für die Studien verwendeten Materialien. In Tabellenform aufgelistet werden Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Arzneimittel, Kits, Primer, Sonden und Antikörper.

Im zweiten Teil des Materialabschnittes wird auf die Versuchstiere sowie auf die Genehmigung des Versuchsvorhabens eingegangen.

3.1 MATERIALAUFLISTUNG

Tabelle 1: Materialauflistung – Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Blutgasanalysegerät ABL800 Basic	Radiometer Medical ApS, Willich, DE
CCI-Impactor	Kopacz, Mainz, DE
Exsikkator Duran Groupe	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Gefrierschrank: - 80 °C	Heraeus Sepatech; Osterode, DE
Gefrierschrank: - 20 °C	Comfort, Liebherr; Ochsenhausen, DE
Handbohrer, Uni-Drive N Komplettgerät	Paggen, Starnberg, DE
Heizofen für HWG	Heraeus, Hanau, DE
ICP Express Systems, Parenchymsonde	Codman, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, DE
Inkubator IC8000	Draeger, Lübeck, DE
Isofluran (Forene) Verdampfer	Abbott, Drägerwerk, Lübeck, DE
Kauter	Fine Science Tools, Neuenhagen, DE
Kyrostat Microm HM 560 Cryo-Star	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Laserdopplergerät PF 4001	Perimed, Järfälla, Schweden
LightCycler System 1.2 und 480	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, DE
LightCycler Software 4.5	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Magnetrührer MR 3001	Heidolph; Schwabach, DE
Mastermill MM 300, Gewebehomogenisator	Retsch, Haan, DE

Minishaker MS1	IKA Works, INC, Wilmington, USA
Minizentrifuge C-1200	Labnet, Woodbridge NJ, USA
Minizentrifuge VWR Mini Star silverline	Kinetic energy Joules
Mikropipetten	Reference, Research, Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskope Wild M420,	Leica; Solms, DE
Mouse-Brain-Matrix	Zivic Instruments, Pittsburgh, USA
NanoVue System - Photometer	GE Healthcare, DE
Qubit™ Fluorometer	Molecular Probes™, Invitrogen,
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
stereotaktischen Rahmen	Kopf Instruments, Tujunga, USA
Temperaturhomöostasegerät (Wärmeplatte)	Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE
Temperatursonde TCAT-2DF	Havard, New Jersey, USA
Tischzentrifugen Centrifuge 5415C,	Eppendorf ; Hamburg, DE
Vortex: Reax control (Laborschüttler)	Heidolph, Hamburg, DE
Zentrifuge Hettich Universal 16 R	Hettich, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Eppendof 5804 R	Hamburg, DE

Tabelle 2: Materialauflistung – Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ALU-Folie, (Laborfolie)	VWR, Darmstadt, DE
Deckgläser 24x50mm	Diagonal GmbH, Münster, DE
Dreiwegehahn BD Connecta	Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden
Faltenfilter	Whatman GmbH, Dassel, DE
Einweghandschuhe Safe Ex	SafeMed, Zimmerwald, DE
Einwegpipetten	Falcon, Becton Dickinson; Heidelberg, DE
Eppendorf Gefäße	StarLab, Ahrensburg, DE
Falconröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Kanülen, Sterican	Braun, Melsungen, DE
Klebstofffestiger Inst-Set	Drechseln & Mehr Weiden, DE
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim, DE
Mäusefutter ssniff	Soest, DE
Mini-Spinsäule	Qiagen, Hilden, DE
Nahtmaterial Permehandseide 6-0, 7-0	Ethicon, Belgien
Nahtmaterial, Prolene 5-0	Ethicon, Belgien
Objektträger (Superfrost plus)	Fischer Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
PCR Reaktionsgefäße (Softtubes 0,5 ml)	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Pinsel	Microm, Thermo Fisher Scientific Walldorf, DE
Pipettenspitzen (1000 µl; 200 µl; 100 µl; 10 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE
Schnittstreckerplättchen aus Glas, 39,5 mm	Microm, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Skalpelle Fig 11, Cutoff	Aesculap, Tuttlingen, DE
Sugi Saugtupfer steril	Kettenbach GmbH & Co KG, Eschenburg, DE
Träger mit Watte, kleiner Kopf	BZ Medizin-Technik, Nierstein, DE
Vlieskompressen 10 x 10 cm 6fach	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE

Tabelle 3: Materialauflistung – Software

Software	Hersteller
Bildbearbeitungsprogramm: Optimas 6.51	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
Dasylab 5.0	measX
FlexPro 6.0	Weisang
Referenzverwaltung: EndNote X4	Carlsbad, USA
Statistik Sigma Plot 11.0	Sigma, SPSS
Tabellenkalkulation	Microsoft, Redmond, USA
Textverarbeitung (Word MS Office 2010)	Microsoft, Redmond, USA

Tabelle 4: Materialauflistung – Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aqua Spüllösung, sterile	Braun, Melsungen, DE
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, DE
Einbettmedium-Gehirn, NEG 50	Thermo Scientific, Walldorf, DE
Ethanol abs. > 99,8%	Roth, Karlsruhe, DE
Frekaderm Spray farblos	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, DE
Histoacryl, Gewebekleber	Braun, Melsungen, DE
Isotonische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, DE
Knochenzement	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, DE
Kresylviolett Acetat	Merck, Darmstadt, DE
Mayers Hämaunlösung	Merck, Darmstadt, DE
NGS – Normal Goat Serum	Dako, Hamburg, DE
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, DE
PBS, Dulbecco Trockensubstanz	Biochrom, Berlin, DE
Roti – Histol	Roth, Karlsruhe, DE
Roti – Histokitt	Roth, Karlsruhe, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf, DE
Super-Gold Cyanoacrylate Klebstoff	Drechseln und Mehr, Weiden, DE
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, DE

Tabelle 5: Materialauflistung – Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	
Ethanol 96%, 70%	Alle Alkoholverdünnungen werden aus Ethanol abs. und Aqua destillata (Aqua dest.) gemischt
Paraformaldehyd 4%	235 ml (Milliliter) Aqua dest. auf 70 °C erhitzen und 18,8 g Paraformaldehyd zugeben. Unter Rühren 0,47 ml 10 molare NaOH dazugeben. Anschließend über einen Faltenfilter und Trichter die angesetzte Lösung filtrieren. Über den gleichen Filter zum Schluss 235 ml 0,2 molaren Phosphatpuffer laufen lassen.
PBS/T	9,55 g PBS (phosphatgepufferte Salzlösung; Dulbecco Trockensubstanz) In 1 Liter Aqua dest lösen für PBST zusätzlich: + 3 ml Triton X 100 (Sigma-Aldrich)
Kresylviolett Farblösung	Nach Zugabe von 5 g Kresylviolett in 100 ml Ethanol wird die Mischung für 30 min mit einem Magnetrührer bei 50 °C gerührt. Nach weiterer Zugabe von 400 ml Aqua dest. die Lösung filtern.
RDD Buffer, DNA Digest Buffer	Qiagen Hilden, DE
RLT-Buffer	Qiagen, Hilden, DE
RPE-Buffer	Qiagen, Hilden, DE
RWT-Buffer	Qiagen, Hilden, DE
Water nuclease-free (RNase frei)	Fermentas, St. Leon Rot, DE

Tabelle 6: Materialauflistung – Arzneimittel

Arzneimittel	Hersteller
Forene® (Wirkstoff: Isofluran)	Baxter, Unterschleißheim, DE
Metacam ®	Boehringer, Ingelheim, DE
Bepanthen-Augensalbe®	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Rimadyl®	Pfizer GmbH, Berlin, DE
Temgesic®	Essex, München, DE

Tabelle 7: Materialauflistung – Kits

Kits	Hersteller
ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Peroxidase, Vectastain ABC Kit Standard PK-6100)	AXXORA, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DAB: Liquid DAB + Substrate Chromogen System	DAKO, Hamburg, DE
DNase-Set (50)	Qiagen, Hilden, DE
LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit	Roche, Mannheim, DE
LightCycler 480 Probes Master FastStart Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim, DE
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche, Mannheim, DE
mi Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
Qiazol Reagenz	Qiagen, Hilden, DE

Tabelle 8: Materialauflistung – Primer

Primer	5' → 3'		Produktlänge
PTGS2-S	TCTTTgCCCAgCACTTC	17	183
PTGS2-R	CCTCTCCACCRATgACCTgA	20	
PPIA F	5'gCgTCTSCTTCgAgCTgTT	19	146
PPIA R	5'RAAgTCACCACCCTggCA	18	
NOS2 F	5'TGT GTC AGC CCT CAG AGT AC	20	312
NOS2 R	5'CAC TGA CAC TYC GCA CAA	18	
mIL6	TCG TGG AAA TGA GAA AAG AGT TG	23	471
mIL6	TAT GCT TAG GCA TAA CGC ACT AG	23	
mulL 1b S	GTG CTG TCG GAC CCA TAT GAG	21	348
mulL 1b A	CAG GAA GAC AGG CTT GTG CTC	21	

Tabelle 9: Materialauflistung – Sonden

Sonden	5' → 3'	Sequenz
Ptgs2 FL	CCAgTCCTCgggTgAACCC--FL	19
Ptgs2 LC	(Red640)-ggTCCTCgCTTMTgATCTgTCTTgAA--(PH)	26
PPIA FL	5'gCTCTgAgCACTggRgAgAAAaggA--FL	24
PPIA Cy5	5'-TTGGCTATAAGGGTTCCTCCTTTTCACAG-3'	28
NOS2 FL	5'gAAgCCCCgCTACTACTCCATC--FL	22
NOS2 LC	5'- Red640-gCTCCTCCCAggACCACACCC--PH	21
mIL6 FL	CAT AAA ATA GTC CTT CCT ACC CCA ATT TCC-FL	30
mIL6 Cy5	Cy5--TGC TCT CCT AAC AGA TAA GCT GGA GTC AC--PH	29
mu IL 1b FL	TAA TGA AAG ACG GCA CAC CCA CCC-FL	24
mu IL 1b 610	Red610--CAG CTG GAG AGT GTG GAT CCC AAG C--PH	25

Tabelle 10: Materialauflistung – Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti Iba-1, Rabbit Wako: 019-19741	WAKO Chemicals, Neuss
Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinylated anti-mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.2 VERSUCHSTIERE UND GENEHMIGUNG DES TIERVERSUCHS

Die Untersuchungen werden an 145 männlichen C57Bl/6N (Black 6N)-Mäusen (Gewicht: 18 - 25 g, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt.

Alle Mäuse werden 24 h vor Versuchsbeginn in Einzelkäfige umgesetzt. Sie haben jederzeit freien Zugang zu Wasser und erhalten täglich drei frische Pellets abgewogenes Futter (ssnif, Soest, DE). Dies entspricht der im Rahmen einer ad libitum Fütterung aufgenommenen Menge für eine Maus dieser Größe. Die Mäuse werden präoperativ nicht nüchtern gehalten, da bei Nagern zur Aufrechterhaltung der Mikroflora des Verdauungstraktes eine ständige Futterzufuhr benötigt wird. Als KäfigEinstreu dienen entkeimte und entstaubte Holzspäne. Des Weiteren stehen jeder Maus eine Plastikröhre als Versteck und ein Papierhandtuch als Material zum Nestbau zur Verfügung.

Die Mäuse werden im Tierstall mit einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, welcher über eine künstliche Beleuchtung gesteuert wird. Die Räume des Tierstalls sind mit einer Raumtemperatur von ca. 22 °C, sowie einer Luftfeuchtigkeit von ca. 60% klimatisiert. Dies entspricht den institutionellen Richtlinien der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Alle für diese Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 genehmigt. Das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz bewilligt die Durchführung der Tierversuche im Tierversuchsantrag 23 177-07/G 11-1-032.

4 METHODEN

Der erste Abschnitt des Methoden-Kapitels dieser Arbeit ist die Darstellung des Studiendesigns mit der Erläuterung der Versuchsgruppen und dem zeitlichen Versuchsablauf. Des Weiteren enthält das Methoden-Kapitel die Beschreibung der für diese Studie durchgeführten Tierexperimente. Das Kapitel der Tierexperimente ist chronologisch aufgebaut und kann in folgende Teile unterteilt werden: Vorbereitungen vor der OP, die OP-Durchführung mit Schilderung des CCI- und SAB-Tiermodells und zuletzt die Tötung der Mäuse mit Präparation des Gehirns und weiterer Probengewinnung.

In den Kapiteln 4.3 und 4.4 werden die durchgeführten Verfahren, die Messtechnik zu Bestimmung des HW-Gehalts und die histologischen Färbungen beschrieben: Die Färbung nach Nissl dient zur Bestimmung des Kontusionsvolumens nach CCI; die Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)-Färbung dient der Ermittlung der aktivierten Mikroglia; die IgG-Färbung veranschaulicht die Öffnung der BHS.

Weiterhin werden in den Kapiteln 4.5 und 4.6 die tägliche Feststellung der physiologischen Parameter (Futteraufnahme und Körpergewicht) sowie die molekularbiologischen Methoden zur Erfassung der Inflammationsparameter beschrieben. Der letzte Abschnitt des Methoden-Teils geht auf Statistik sowie verwendete Score-Systeme ein. Während der Studien und Auswertungen sind beteiligte Personen verblindet.

4.1 STUDIENDESIGN

Die für diese Arbeit durchgeführten Studien werden in zwei Teile unterteilt, die CCI- und die SAB-Studie. Die CCI-Studie kann ihrerseits in zwei Teilstudien unterteilt werden: In der ersten CCI-Teilstudie beträgt die postoperative Überlebenszeit der Tiere 24 h. Diese Studie wird CCI-24 h-Studie genannt. Mit dem Gehirngewebe dieser Tiere werden HW-Gehalt und Entzündungsparameter bestimmt. Die zweite CCI-Teilstudie weist eine postoperative Überlebenszeit von 5 d auf. Sie wird CCI-5 d-Studie genannt und dient der Gewinnung kryokonservierter Gehirne zur Herstellung der Hirschnitte.

Der SAB-Versuch besteht aus einer Studie mit einer postoperativen Überlebenszeit von 24 h. Die in dieser Studie, der SAB-24 h-Studie gewonnenen Gehirne werden zur Bestimmung der Entzündungsparameter genutzt.

Die Fallzahlermittlung erfolgte in der Phase der Versuchsplanung mit dem Programm Sigma Plot 11.0. Sie wurde für alle Versuche mit der ANOVA Fallzahlermittlung durchgeführt. Bei der CCI-24 h-Studie und SAB-24 h-Studie wurde der Parameter HW-Gehalt als Berechnungsgrundlage verwendet. Die Ergebnisse der HW-Gehalts-Analyse der SAB Tiere konnte nicht ausgewertet werden auf Grund eines technischen Defekts der Waage während des Versuchs. Um die Fallzahl in der CCI-5 d-Studie zu berechnen wurde das Kontusionsvolumen als Grundlage für die Fallzahlermittlung verwendet. Bei allen Berechnungen ist eine statistische Power von 0,8 und der Alpha-Level von 0,05 verwendet worden. Ein Gruppenvergleich von 4 Gruppen wurde für die Ermittlung aller Berechnungen durchgeführt. Um einen Unterschied von 1% im HW-Gehalt (Standardabweichung: 0,62%) zu zeigen, wurde die Gruppen-Tierzahl von $n = 10$ berechnet. Um einen Unterschied von 10 mm^3 (Standardabweichung $6,2 \text{ mm}^3$) im Kontusionsvolumen zu ermitteln wurden ebenfalls $n = 10$ Tiere berechnet.

In den SAB Versuchen konnten von den 50 Versuchstieren nur 25 eingeschlossen werden, auf Grund einer anatomischen Variation. Es wurde somit eine Gruppenstärke von nur $n = 5$ erreicht. In der Zwischenanalyse ergaben sich Unterschiede in dem KS, deshalb wurden die Fehlversuche nicht wiederholt.

4.1.1 GRUPPENGROßEN UND GRUPPENBESCHREIBUNG

In Tabelle 11 sind die verschiedenen Gruppen der durchgeführten Tierversuche mit Überlebenszeit und Tierzahlen aufgelistet.

Tabelle 11: Versuchsgruppen mit Überlebenszeit und Tierzahlen

Medikamentengruppe	CCI- 24 h	CCI- 5 d	SAB- 24 h
Buprenorphin-Gruppe mit OP (Bu)	10 Mäuse	10 Mäuse	5 Mäuse
Carprofen-Gruppe mit OP (Ca)	10 Mäuse	10 Mäuse	5 Mäuse
Meloxicam-Gruppe mit OP (Mel)	10 Mäuse	10 Mäuse	5 Mäuse
NaCl (Natriumchlorid)-Gruppe mit OP (Veh)	10 Mäuse	10 Mäuse	5 Mäuse
Sham-Gruppe mit Buprenorphin (Sh-Bu)	10 Mäuse	-	-
Sham-Gruppe mit Carprofen (Sh-Ca)	10 Mäuse	-	-
Sham-Gruppe mit Meloxicam (Sh-Mel)	10 Mäuse	-	-
Sham-Gruppe mit NaCl (Sh-NaCl)	10 Mäuse	-	5 Mäuse
Gesamt tierzahl	80 Mäuse	40 Mäuse	25 Mäuse

4.1.1.1 Buprenorphin-Gruppe mit Operation

Die Bu-Gruppe ist eine Versuchsgruppe, bei der die Versuchstiere das Opiod Buprenorphin in einer Dosis von 0,1 mg/kg im 12 h-Rhythmus s.c. injiziert bekommen. Das Medikament Temgesic® (Essex, München, DE) ist mit isotonischer Kochsalzlösung auf 0,01 mg/ml verdünnt, so dass jede Maus 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht erhält: Das entspricht einem Gesamtinjektionsvolumen pro Maus von ca. 0,18 - 0,25 ml. Die Applikationsmenge wird täglich an das vorliegende Körpergewicht angepasst.

4.1.1.2 Carprofen-Gruppe mit Operation

Die Ca-Gruppe bekommt das NSAID Carprofen in einer Dosierung von 5 mg/kg verabreicht. Dieser Wirkstoff ist im Medikament Rimadyl® (Pfizer GmbH, Berlin, DE) enthalten. Rimadyl® (Pfizer GmbH, Berlin, DE) wird mit isotonischer Kochsalzlösung auf 0,5 mg/ml verdünnt und jeder Maus 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht s.c. injiziert. Das sich aus der Verdünnung ergebende Injektionsvolumen liegt, wie bei der Bu-Gruppe, bei 0,18 - 0,25 ml. Die Injektionsmenge wird nach Messung des täglichen Körpergewichts adaptiert.

4.1.1.3 Meloxicam-Gruppe mit Operation

Die Mel-Gruppe wird mit Meloxicam, das in Form des Medikaments Metacam® (Boehringer Ingelheim, DE) verabreicht wird, therapiert. Dazu wird Metacam® (Boehringer Ingelheim, DE) mit isotonischer Kochsalzlösung zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt. Dosierungsempfehlung und Injektionsintervall von 24 h entspricht den Empfehlungen der GV-Solas (5).

4.1.1.4 Vehikel-Gruppe mit Operation

Die Veh-Gruppe dient dem Vergleich von operierten Tieren ohne Schmerzmittel (nur mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt) zu den Gruppen mit Schmerzmittel. Tiere dieser Gruppe erhalten keine Analgesie, sondern die gleiche Anzahl an Injektionen mit entsprechenden Volumina isotonischer Kochsalzlösung. In dieser Gruppe wird das Injektionsvolumen ebenfalls täglich an das vorliegende Körpergewicht angepasst.

4.1.1.5 Sham-Gruppen

Eine weitere Kontrollgruppe, die Sham-Gruppe, beinhaltet Tiere, die der kompletten OP unterzogen werden – allerdings ohne Auslösung des Schadens (CCI bzw. SAB). Diese Gruppe existiert in der CCI-24 h-Studie sowohl mit analgetischer Behandlung (für jedes Analgetikum eine eigene Sham-Gruppe) als auch mit der Verabreichung des Vehikels. Im SAB-Versuch wird die vorhandene Sham-Gruppe mit dem Vehikel isotonische Kochsalzlösung behandelt.

4.1.2 ZEITLICHER VERSUCHSABLAUF / STUDIENDESIGN

Zum besseren Verständnis des detaillierten Ablaufs der in den Einzelstudien durchgeführten Schritte werden diese mithilfe eines Pfeildiagramms dargestellt.

Die Studien mit einer Überlebenszeit von 24 h (CCI-24 h-Studie / SAB-24 h-Studie) sind in Abb. 9, die mit einer Überlebenszeit von 5 d (CCI-5 d-Studie) in Abb. 10 skizziert.

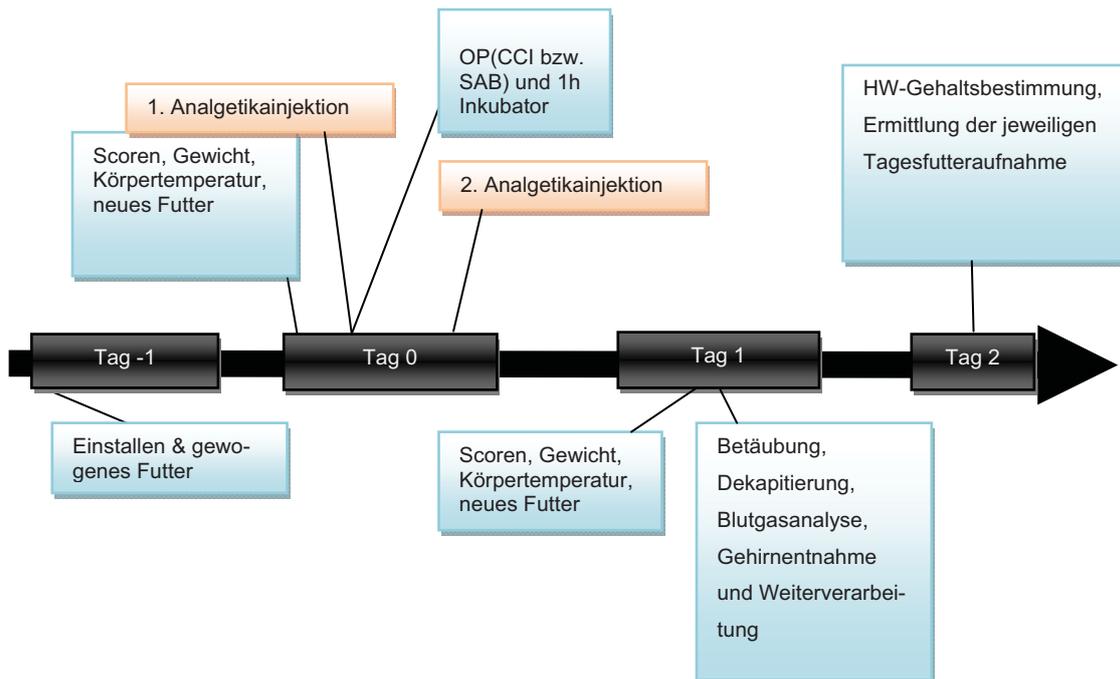


Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Studien CCI-24 h und SAB-24 h

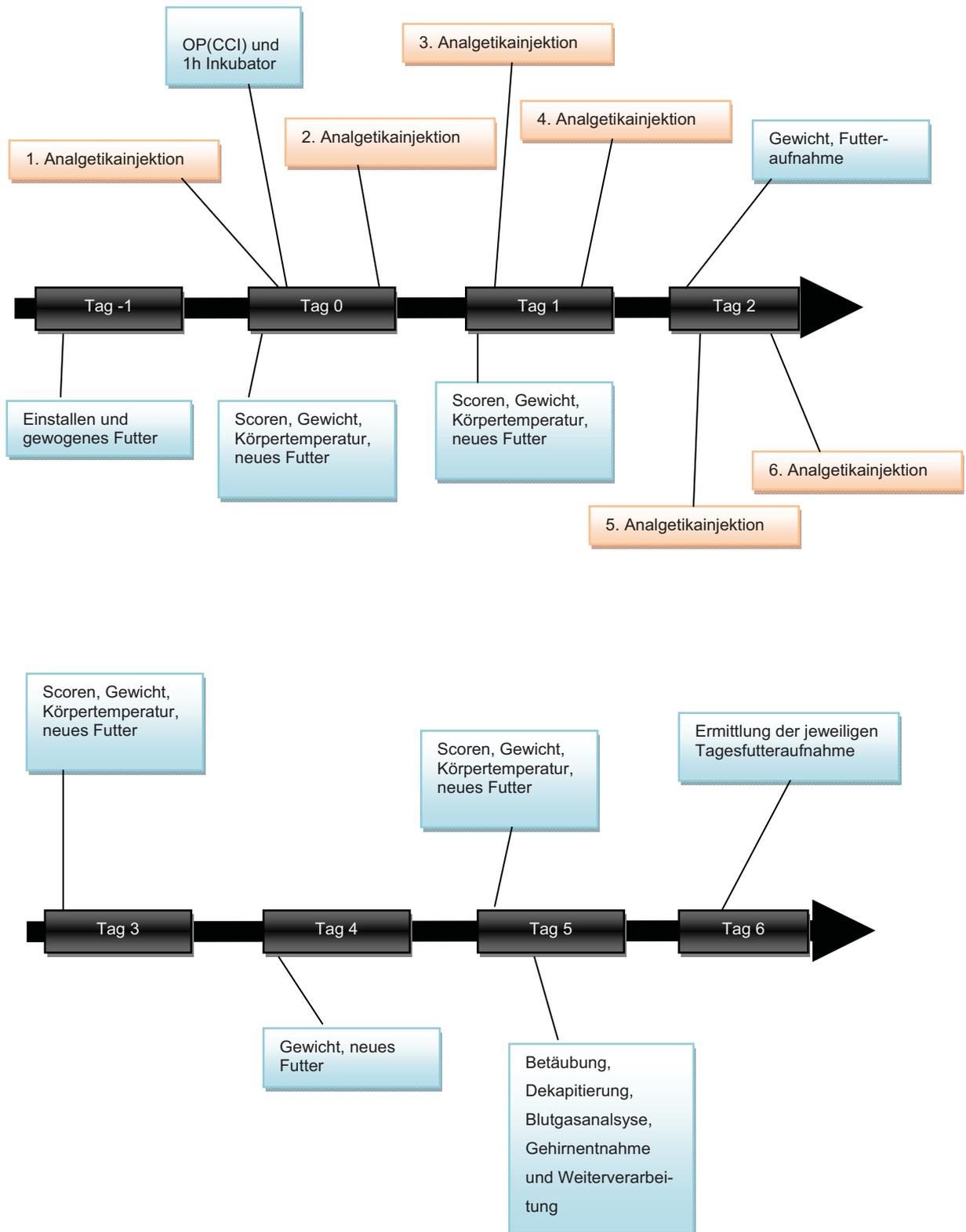


Abbildung 10: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Studie CCI-5 d

4.2 TIEREXPERIMENTE

4.2.1 VORBEREITUNGEN VOR DER OPERATION

4.2.1.1 Haltung und Fütterung der Tiere

Jede Maus wird ab einem Zeitpunkt von 24 h vor Durchführung der OP in einen Einzelkäfig umgesetzt und erhält drei vorgetrocknete Futterpellets (ssniff, Soest, DE), welche alle 24 h erneuert werden. Präoperativ werden für jedes Tier ein Neuroscore (NS) sowie ein KS durchgeführt. Zusätzlich wird das Körpergewicht ermittelt.

4.2.1.2 Medikamentöse Aufbereitung

Die verwendeten Analgetika (kommerzielle Lösungen) werden mit 0,9%iger Kochsalzlösung zu einer mäuseadaptierten Konzentration verdünnt. Die folgenden Konzentrationen werden den Tieren gewichtsadaptiert verabreicht, als Vehikel-Kontrolle wird 0,9%ige Kochsalzlösung verwendet.

Buprenorphin:	0,1 mg/kg im 12 h-Rhythmus, Temgesic® verdünnt: Konzentration c = 0,01 mg/ml
Carprofen:	5 mg/kg im 12 h-Rhythmus, Rimadyl® verdünnt: Konzentration c = 0,5 mg/ml
Meloxicam:	1 mg/kg im 24 h-Rhythmus Metacam® verdünnt: Konzentration c = 0,1 mg/ml

4.2.2 OPERATIONS DURCHFÜHRUNG

4.2.2.1 Narkoseeinleitung und Überwachungsparameter

Die Einleitung der Narkose erfolgt in einer Isofluranatmosphäre von 4% für 45 sec unter einem Plastik-Trichter. Mit Eintritt der Bewusstlosigkeit wird das Tier auf eine Wärmeplatte (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) gelegt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt als Maskennarkose mit 1,4 - 1,5% Isofluran. Hierzu wird eine selbsthergestellte Maske aus einem Gummihandschuh mit einem Gefäßclip so dem Mäusekopf angepasst, dass die Maske annähernd dicht ist.

Bei diesem Narkosesystem handelt es sich um ein System mit einem konstanten Flow von 0,5 l/min Frischluftzufuhr und 1,0 l/min Sauerstoff mit aktivem Gasabzug; die Maus zeigt eine Spontanatmung. Anschließend wird das Tier mit Bepanthen-Augensalbe® (Bayer Vital, Leverkusen, DE) versorgt und erhält eine Temperaturmesssonde (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) zur perioperativen Temperaturkontrolle rektal eingeführt. Da aus tierexperimentellen Studien bekannt ist, dass Hypothermie einen neuroprotektiven Effekt hat und den ICP senkt (128, 146) und dies in vorliegender Studie nicht gewünscht ist, wird die Körpertemperatur der Maus über eine rückgekoppelte Wärmeplatte (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) auf 37 °C konstant gehalten.

4.2.2.2 Applikation der Medikamente

Jedem Tier wird nach Einsetzen der Narkose eine erste randomisierte und gewichtsadaptierte Injektion verabreicht. Diese erfolgt s.c. an der seitlichen Bauchwand. Dabei erhält die Versuchsgruppe eines der Analgetika, und die Kontrollgruppe 0,9%ige isotonische Kochsalzlösung. Die Verdünnung der kommerziellen Analgetika ist in Kapitel 4.2.1.2 erläutert. Die Behandlung mit Buprenorphin und Carprofen erfolgt alle 12 h. Folglich bekommt jedes Tier mit einer Überlebenszeit von 24 h insgesamt zwei Injektionen. Die Tiere mit einer Überlebenszeit von fünf Tagen werden an den ersten drei Tagen mit insgesamt sechs Injektionen therapiert (Empfehlung GV-Solas (5)). Da Meloxicam alle 24 h verabreicht werden muss, empfängt jedes Meloxicam-Tier die gleiche Spritzenanzahl wie die Buprenorphin- und Carprofen-Tiere, allerdings besteht jede zweite Injektion aus dem Vehikel 0,9%ige isotonische Kochsalzlösung.

4.2.2.3 Induktion des Schädel-Hirn-Traumas

4.2.2.3.1 Durchführung des Schädel-Hirn-Trauma CCI-Modells

Das SHT wird durch das CCI-Tiermodell hervorgerufen. Dafür wird die Maus nach der Narkoseeinleitung in einem stereotaktischen Rahmen eingespannt (Abb. 11). Der Mäusekopf wird durch Einhängen der Incisivi fixiert. Die Maus liegt während der OP zur Temperaturerhaltung auf einer Wärmeplatte (Temperaturhomöostasegerät, Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE) (Abb. 12).

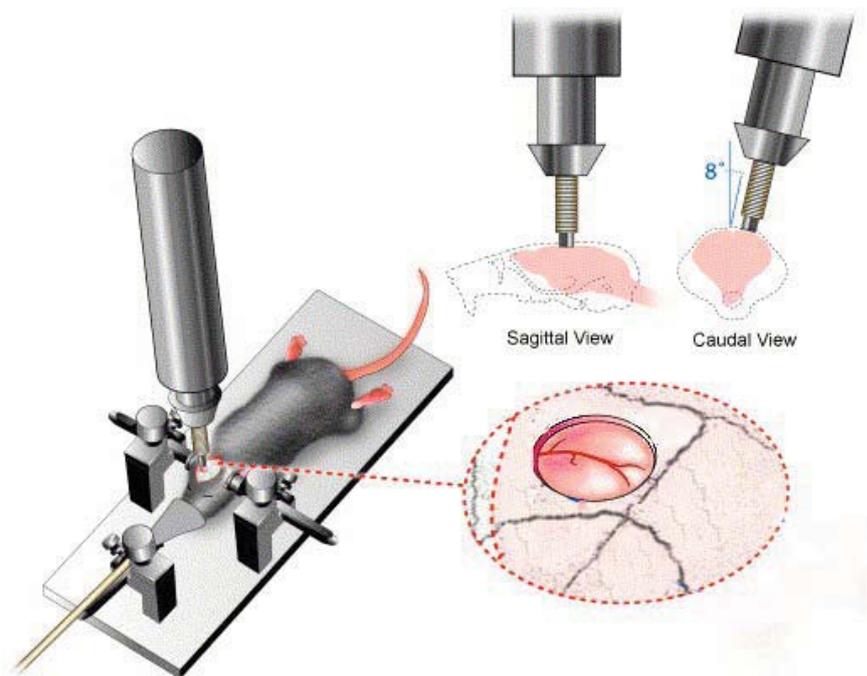


Abbildung 11: Schematische Darstellung des CCI-Modells mit Ansatzstelle des CCI-Impactors. Modifiziert nach Onyszchuk 2007 (104)

Zur Freilegung des Schädelknochens erfolgt ein medialer Hautschnitt mit einer Länge von ca. 1,5 cm. Das Periost wird vorsichtig mit zwei Wattetupfern zur Seite geschoben. Die Schädeldecke ist von vorderer (Bregma) bis hinterer Koronarnaht (Lamba) freigelegt. Mithilfe eines Mikrobohrers (Handbohrer Uni-Drive N Komplettgerät, Paggen, Starnberg, DE) erfolgt anschließend eine Kraniotomie, welche als Ergebnis ein rechteckiges Fenster hat. Die geöffneten Kanten des Fensters stellen Bregma, Lamba sowie Arcus zygomaticus dar. Alle Seiten des Fensters bis auf die mediale, die als Scharnier dient, werden unter Schonung der Dura mater aufgefräst; die mittlere Fensterkante wird beim Öffnen des Knochenfensters lediglich angebrochen.

Mithilfe des CCI-Impactors (Kopacz, Mainz, DE) (Abb. 12), der einen kontrolliert pneumatisch betriebenen Bolzen beinhaltet (\varnothing 2,5 mm), wird eine Kontusion des Cortex in diesem Gehirnabschnitt erzeugt. Das Knochenfenster wird anschließend wieder zugeklappt und mit Histoacryl-Gewebekleber (Braun, Melsungen, DE) die Kraniotomie verschlossen. Die Haut wird mit zwei Knopfheften (Permahandseide 6-0, Ethicon, Belgien) geschlossen. Nach Beendigung der Narkose verbringen die Tiere 1 h im Inkubator (IC8000, Draeger, Lübeck, DE) bei einer Temperatur von 33 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 35%.

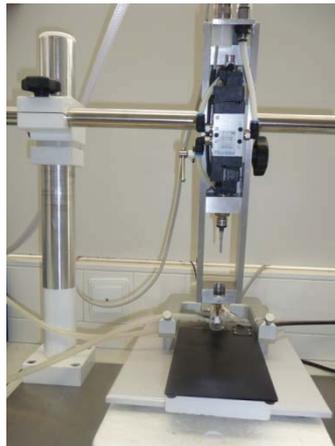


Abbildung 12: CCI-Impactor (Neurotrauma-Erzeugungs-Anlage), schwarze Wärmeheizplatte unter Impactor eingelegt

4.2.2.3.2 Sham-Operation CCI

Die Tiere der Sham-Gruppe erhalten alle präparatorischen Schritte bis auf das Trauma. Sie werden einer 15-minütigen Anästhesie in einer 2,3%-Isofluranatmosphäre unterzogen. Bei den Mäusen dieser Gruppe werden auch eine Inzision der Kopfhaut sowie die Trennung des Periosts vorgenommen. Es erfolgt keine Kraniotomie, da schon durch die Hitzeeinwirkung des Bohrers Entzündungsparameter im Gehirn beeinflusst werden können (24), was nicht erwünscht ist. Die bei Sham-Tieren nicht durchgeführte Kraniotomie wird durch Ankratzen des Knochens mit einer spitzen Pinzette ersetzt.

4.2.2.4 Induktion der Subarachnoidalblutung

4.2.2.4.1 Chirurgische Installation der Messgeräte zur Subarachnoidalblutungs-Operation, ICP-Sonde und Laser-Doppler-Fluxmetrie

Die für die intrakranielle Druckmessung benötigte ICP-Sonde (ICP Express Systems, Codman, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) (Abb. 13) wird beim ersten Schritt der OP an dem in Bauchlage liegenden Tier an der rechten (re.) Kopfseite angebracht. Hierfür wird die Haut zwischen Auge und Ohr ca. 2,5 mm inzidiert und der Musculus (M.) masseter dargestellt. Mit einer Skalpellklinge (Aesculap, Tuttlingen, DE) wird der M. masseter in einem Bereich von 1,5 mm an seinem Ursprung abpräpariert; in die freigelegte Knochenplatte zwischen Bregma und Lambda wird mit einem Rosenbohrer (\varnothing 1,4 mm) ein Loch gefräst. Durch dieses Bohrloch erfolgt die Einführung der ICP-Sonde (ICP Express Systems, Codman, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE), die zwischen Gehirn und Schädeldecke dorsal so weit vorgeschoben wird, bis der Sondenkopf (Abb. 13) komplett in der Schädelhöhle verschwunden ist (Abb.14). Die Befestigung der Sonde erfolgt mit Zinkpolycarboxylatezement (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, DE) an der Schädelkalotte. Die Hirndruckmessung wird mittels Codman ICP Express System (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) durchgeführt; die Auswertung mit dem Programm DasyLab 5.0 (measX).

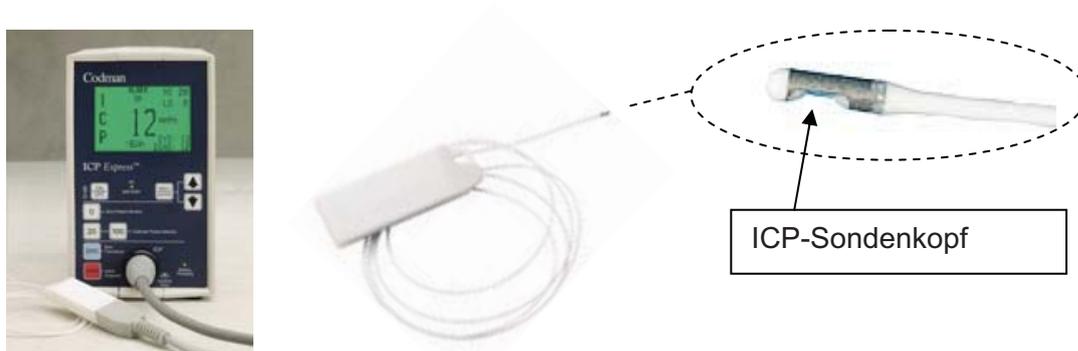


Abbildung 13: Codman ICP microsensor und ICP-Sondenkopf (86)

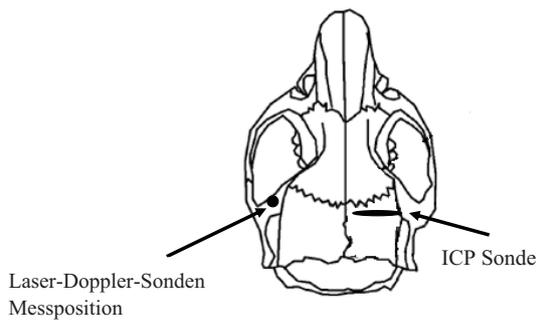


Abbildung 14: Darstellung der ICP Messposition und Laser-Doppler-Sonden Messposition bei SAB. Modifiziert nach Zweckberger 2006 (165)

Um die intrakranielle zerebrale Durchblutung zu messen, wird an der linken (li.) Seite des Mauskopfes (Maus in Bauchlage) eine Laser-Doppler-Sonde fixiert (Positionierung der Laser-Doppler-Sonde: Abb. 14). Eine Hautinzision mit einer Länge von 2,5 mm wird zwischen Auge und Ohr gesetzt und dadurch der M. masseter dargestellt. Durch Abpräparation des M. masseter in seinem Ursprung wird ein weiteres Stück der Schädelkalotte freigelegt, an dem die Laser-Doppler-Sonde mithilfe von Super-Gold Cyanoacrylate-Klebstoff (Drehkeln und Mehr, Weiden, DE) und Insta-Set Klebstofffestiger (Drehkeln und Mehr, Weiden, DE) festgeklebt wird. Durch Anschließen der Laser-Doppler-Sonde an ein 2-Kanal-Laser-Doppler-Gerät PF4001 (Perimed, Järfälla, Schweden) wird die zerebrale Durchblutung gemessen und aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der Daten beginnt vier Minuten vor und endet sechs Minuten nach Induktion der SAB.

Zur Durchführung der SAB-OP auf der linken Körperseite wird das Tier in Rückenlage gebracht und der Genickbereich durch eine gepolsterte Pinzette unterlagert, um die Streckung des Halses zu gewährleisten.

4.2.2.4.2 Durchführung des Subarachnoidalblutung-Tiermodells

Die SAB wird durch das Bederson-Tiermodell, das durch **Feiler et al.** (86) modifiziert wurde, induziert. Dieses Tiermodell ist ein Fadenmodell; es ruft eine endoluminale Perforation des Circulus willisii hervor was zu einer Blutung in den Subarachnoidalraum führt.

Durchführung:

An dem narkotisierten, sich in Rückenlage befindenden Tier erfolgt ein 2 cm langer Hautschnitt. Dieser wird li. paramedian am Hals gesetzt und endet kaudal am Sternum. Nach Präparation und stumpfer Durchtrennung der Speicheldrüsen und des subcutanen Fettgewebes wird die A. carotis communis aufgesucht und dargestellt. Zur Darstellung der

Aufzweigung der A. carotis communis in A. carotis externa und A. carotis interna wird die A. carotis communis weiter rostral freipräpariert (Gefäßaufzweigung siehe Abb. 15); median gelegene, kleine Gefäßabgänge werden verödet (Kauter, Fine Science Tools Neugenhagen, DE).

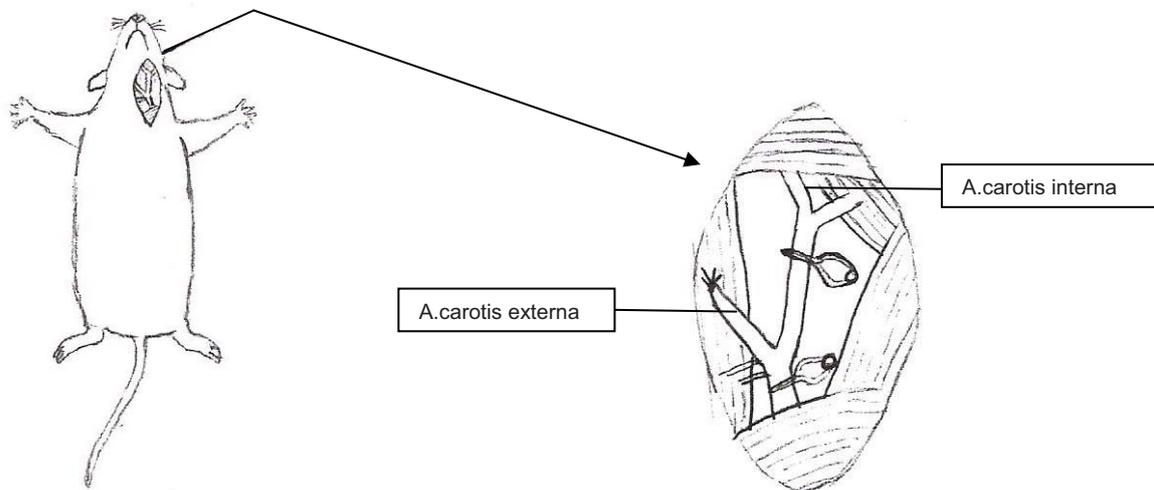


Abbildung 15: SAB-OP; Lagerung und schematische Darstellung der frei präparierten Arterien. Modifiziert nach Luh 2011 (86)

Der N. vagus wird bei der Darstellung der Gefäße geschont. Die freipräparierte A. carotis externa wird soweit rostral wie möglich mit einer Ligatur (Permahandseide 6-0, Ethicon, Belgien) verschlossen. Ein weiterer Faden (Permahandseide 7-0, Ethicon, Belgien) wird kaudal der vorherigen Ligatur vorgelegt. Das Anbringen eines Gefäßclips am Übergang zur A. carotis interna sowie eines Gefäßclips im Bereich der A. carotis communis stoppt temporär den Blutfluss. Mit einer Gefäßschere wird die A. carotis externa kurz unterhalb der gelegten Ligatur halb eröffnet. Durch diese Öffnung wird ein starrer monofiler Faden (Prolene 5-0, Ethicon, Belgien) eingeführt und im Gefäßlumen durch den vorgelegten Faden fixiert. Daraufhin erfolgt die Entfernung der Gefäßclips. Die bestehende Gefäßwandbrücke zwischen der oberen permanenten Ligatur der A. carotis externa und der Faden-Halte-Ligatur der A. carotis externa wird mit einer Gefäßschere durchtrennt. Der mobile, in der A. carotis externa steckende Faden kann vorsichtig kaudal umgeklappt werden (Abb. 16). Der steife, im Gefäßlumen steckende Faden wird anschließend solange rostral in der A. carotis interna vorgeschoben, bis die Laser-Doppler-Werte auf ca. die Hälfte abgefallen sind: Damit sitzt der Faden an der richtigen Stelle, um die Punktion des Circulus willisii durchzuführen. Durch weiteres Vorschieben des steifen Fadens wird eine Perforation des Circulus willisii ausgelöst. Das ausströmende Blut führt zu einem Druckanstieg im Gehirn, dies ist an den ansteigenden ICP-Werten sichtbar.

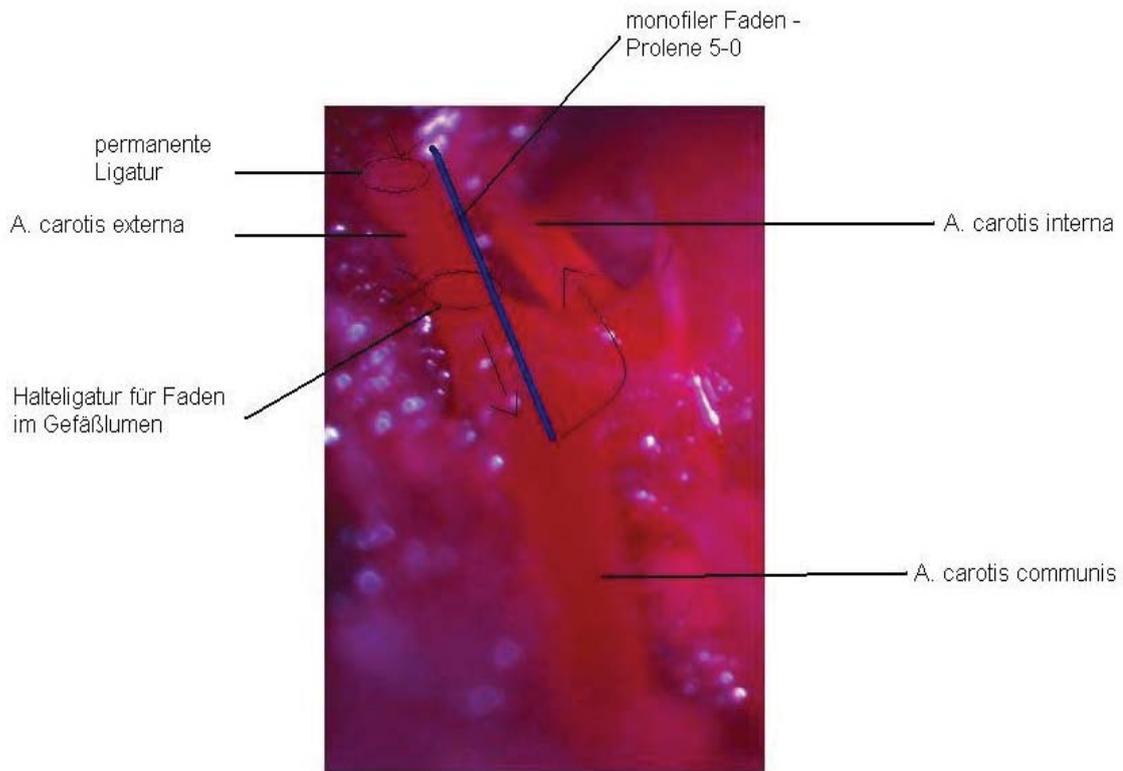


Abbildung 16: Fadenführung in der SAB-OP; Faden steckt im Gefäßlumen und wird in Pfeilrichtung vorgeschoben

Sofortiges Zurückziehen des Fadens ermöglicht eine vollständige Freigabe des Gefäßlumens für Blut. Das bewirkt eine stärkere Einblutung in den Subarachnoidalraum. Anschließend wird der Faden vollständig aus dem Gefäßlumen entfernt und die Halteligatur verschlossen.

Der Verschluss der Hautwunde am Hals erfolgt durch zwei Knopfhefte (Permahandseide 6-0, Ethicon, Belgien). Mit einer Schere wird die Laser-Doppler-Sonde (Laser-Dopplergerät PF 4001 Perimed, Järfälla, Schweden) so eng wie möglich am Kopf der Maus abgeschnitten. Ein 0,5 mm langer Sondenrest sowie der Klebstoff verbleiben an der Maus, da eine komplette Entfernung der Sonde eine große, nicht notwendige Wunde verursachen würde. Die ICP-Sonde (ICP Express Systems, Codman, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) wird vorsichtig aus dem Schädel gezogen und die Schädelöffnung mit Zinkpolycarboxylatezement (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, DE) verschlossen. Mit einem Knopfheft (Permahandseide 6-0, Ethicon, Belgien) erfolgt der Verschluss der Hautwunde über der verschlossenen Schädelöffnung. Die Maus verbringt postoperativ 1 h im Inkubator (IC8000, Draeger, Lübeck, DE) bei 33 °C und 35% Luftfeuchtigkeit. Die Dauer der OP und Narkose betragen durchschnittlich 60 min.

4.2.2.4.3 Sham-Operation SAB

Alle Tiere der Sham-Gruppe erhalten eine Isofluran-Maskennarkose mit der Konzentration von ca. 1,5% für eine Dauer von 60 min. Aus Gründen der Gehirnverletzungsgefahr wird bei den Mäusen keine ICP-Sonde (ICP Express Systems, Codman, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) auf der re. Seite des Schädels angebracht, sondern lediglich die Laser-Doppler-Sonde (Laser-Dopplergerät PF 4001 Perimed, Järfälla, Schweden) auf der li. Schädelseite fixiert. Im Halsbereich erfolgt dieselbe Präparation wie bei den SAB-operierten Mäusen, allerdings ohne Auslösen der SAB-Blutung. Die weitere Behandlung ist bei den Sham-Tieren gleich wie bei den SAB-operierten Tieren.

4.2.3 TÖTUNG UND BLUTPROBENENTNAHME

Vor der Tötung durchläuft jede Maus ein weiteres Mal den NS, den KS sowie die Gewichtskontrolle. Eine Ermittlung der Futteraufnahme in den letzten 24 h durch Wiegen des restlichen Futters wird durchgeführt.

Zum Tötungszeitpunkt der studienabhängig bei 24 h oder 5 d liegt, werden die Tiere betäubt; dazu werden die SAB-Mäuse zur Narkoseeinleitung einer 4%igen Isofluranatmosphäre unter einem Trichter für 45 sec ausgesetzt. Die CCI-Mäuse werden, in einem Becherglas sitzend, in einer Isofluranatmosphäre in tiefe Narkose versetzt. Die Becherglasmethode wird angewendet, da aus Rücksicht auf die Gesundheit der Labormitarbeiter versucht wird, durch Minimierung der Konzentration von Isofluran im Raum die chronische Exposition zu reduzieren.

Bei allen SAB-Mäusen wird vor der Tötung in tiefer Narkose der aktuell vorliegende Hirndruck durch Öffnung des Knopfheftes der Haut, Entfernung des Zinkpolycarboxylatzements (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, DE) und Einführung der ICP-Sonde (ICP Express Systems, Codman, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE) gemessen.

Beim Tötungsvorgang wird die Maus vor einer fast senkrecht stehenden, von hinten eisgekühlten Petrischale dekapitiert. Durch den vorhandenen Blutdruck spritzt Blut gegen die Petrischale und läuft an dieser herunter. Kühlung verhindert die sofortige Gerinnung des Blutes, das für die Durchführung einer Blutgasanalyse verwendet wird.

4.2.4 PRÄPARATION, ENTNAHME UND ZERTEILUNG DES GEHIRNS

4.2.4.1 Controlled-Cortical-Impact-Gehirn

Die Haut des Schädels wird medial eröffnet, des Weiteren erfolgt eine Öffnung der Schädelkalotte von occipital nach frontal, ohne das Gehirn zu verletzen. Daraufhin werden die spinalen Fasern, der N. olfactorius und der Sehnerv getrennt. Anschließend wird das Gehirn mit einem Spatel entnommen, in eine „Mouse Brain Matrix“ (Zivic Instruments, Pittsburgh, USA) gelegt und mit Skalpellklingen in definierte Sektionen geschnitten (Abb. 17).

Die Schnittführung der Gehirne der 24 h-CCI-Gruppen wird wie folgt durchgeführt: Abtrennung des Kleinhirns durch einen Sagittalschnitt und Heraustrennung von zwei jeweils 3 mm breiten Scheiben des Großhirns. Aus der geschädigten Hemisphäre der kaudalen Gehirnscheibe wird eine Hippocampusprobe zur Bestimmung der Inflammationsparameter entnommen. Mit der rostralen Scheibe des Gehirns wird der HW-Gehalt bestimmt, indem die Scheibe in ein vorgetrocknetes Hirnwasser-Schälchen eingewogen wird.

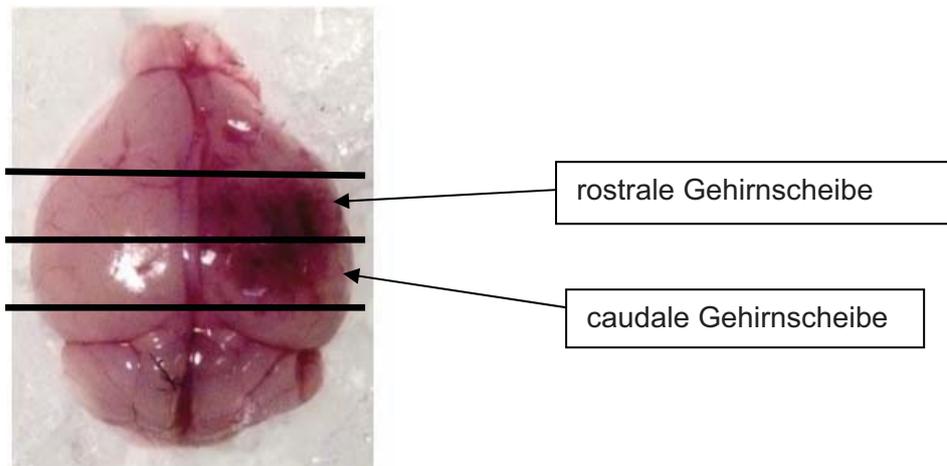


Abbildung 17: Frisch entnommenes Mäusegehirn mit CCI-Schaden, Schnittschema zur Gewinnung der benötigten Gehirnabschnitte. Modifiziert nach Luh (86)

4.2.4.2 Subarachnoidalblutungs-Gehirn

Die Entnahme des SAB-Gehirns erfolgt analog der Gehirnentnahme nach der CCI-OP.

Das Schnittschema wird wie folgt durchgeführt: Als erstes wird das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt, um anschließend eine 4 mm dicke kaudale Scheibe des Großhirns zu gewinnen. Aus dieser Scheibe wird der Hippocampus isoliert und zur RNA (Ribonukleinsäure) - Analyse verwendet. Der Rest des Gehirns wird verworfen.

Alle gewonnenen Gewebeproben werden in flüssigem Stickstoff konserviert und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

4.3 MESSUNG DES HIRNWASSERGEHALTS

Für die Bestimmung des HW-Gehalts wird die Wet-Dry-Methode verwendet: Es erfolgt eine Wiegung der für die Messung des HW-Gehalts vorgesehene Frischgehirnscheibe, um das Feuchtgewicht zu ermitteln. Nach einer 24 stündigen Trocknungsphase im Ofen (Heizofen, Heraeus, Hanau, DE) bei 105 °C erfolgt die Bestimmung des Trockengewichts der Gewebeprobe. Der HW-Gehalt wird mit folgender Formel errechnet:

$$HW - \text{Gehalt (\%)} = \frac{(\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht})}{\text{Feuchtgewicht}} * 100$$

4.4 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN UND MORPHOMETRIE

Die histologischen Auswertungen umfassen die Färbung nach Nissl, die Iba-1-Färbung sowie die IgG-Färbung; sie werden an den Gehirnen der Studie CCI-5 d durchgeführt. Die Nissl-Färbung dient der Ermittlung des Kontusionsvolumens, die Iba-1-Färbung ermöglicht eine Ermittlung der Anzahl aktivierter Mikroglia im Gehirn, die IgG-Färbung soll die geöffnete BHS nach SHT veranschaulichen.

4.4.1 HERSTELLUNG DER HIRNSCHNITTE FÜR DIE HISTOLOGISCHEN FÄRBUNGEN

Die Gehirne, die für histologische Färbungen vorgesehen sind, werden mit pulverisiertem Trockeneis tiefgefroren und bei -20 °C gelagert. Mit dem Kryostat (Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE) werden sagittal geschnittene Scheiben des Gehirns angefertigt, die Schnitte werden alle 500 µm entnommen und weisen eine Dicke von jeweils 10 µm auf. Die Ebene des ersten Schnitts wird als Bregma + 3,14 mm definiert.

Pro Gehirn werden 16 Schnitte gewonnen und auf zwei „Superfrost plus“-Objektträgern (Fischer Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE) platziert. Die Lagerung der Objektträger erfolgt bei -20 °C.

4.4.2 FÄRBUNGEN UND AUSWERTUNGSMETHODEN DER GEFÄRBTEN SCHNITTE

4.4.2.1 Nissl-Färbung

Die Färbung nach Nissl dient der Anfärbung von Nervengewebe, mit der eine Quantifizierung des Hirnschadens mittels Volumetrie durchgeführt wird. Der Farbstoff Kresylviolett bindet an basophile Stoffe wie Desoxyribonukleinsäure (DNA) und RNA. Strukturen mit einem hohen Gehalt an DNA oder RNA, wie sie in Zellorganellen vorkommen, färben sich dadurch violett; die anderen Strukturen bleiben ungefärbt. Mit der Nissl-Färbung werden in den Zellkörpern sogenannte Nissl-Schollen sichtbar; sie entsprechen dem rauen endoplasmatischen Retikulum.

Das Verfahren beginnt damit, dass die Objektträger mit den gefrorenen Schnitten vor der Färbung 1 h bei Raumluft getrocknet werden. Nach dem Trocknen werden sie zuerst für

2 min in 70%igem Ethanol und anschließend für 10 min in eine Standard-Kresylviolett-Lösung gestellt. Anschließend erfolgt ein zweimaliges Tauchen der Objektträger in Aqua dest. (Braun, Melsungen, DE), um die überschüssige Farbe zu entfernen. Mit der folgenden aufsteigenden Alkoholreihe werden die Hirnschnitte entwässert (2 x kurz 70% Ethanol, 2 x kurz 96% Ethanol). Als letztes erfolgt die Fixierung der Schnitte in Roti-Histol (Roth, Karlsruhe, DE) (5 min und 2 min) und anschließend wird ein Deckgläschen (Diagonal, Münster, DE) mit Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, DE) auf dem Präparat fixiert zum Schutz der Präparate.

4.4.2.2 Bestimmung des Kontusionsareals und Kontusionsvolumens

Die nach Nissl gefärbten Schnitte (Abb. 18) werden am Computer mithilfe des Programmes Optimas 6.51 (Optimas Corporation, Bothell, WA) ausgewertet. Das Kontusionsareal wird verblindet ausgewertet. Das Areal, welches vom Kresylviolett lediglich schwach angefärbt ist, lässt sich als Schadenszone definieren. In diesem Bereich sind die DNA und RNA stark geschädigt. Von jeder gefärbten Gehirnebene werden beide Hemisphären sowie zusätzlich das nicht beschädigte Areal der ipsilateralen Hemisphäre ausgemessen. Mit folgender Formel wird das Kontusionsvolumen berechnet:

$$V = \sum_{1}^{16} Ax * 500 \mu m$$

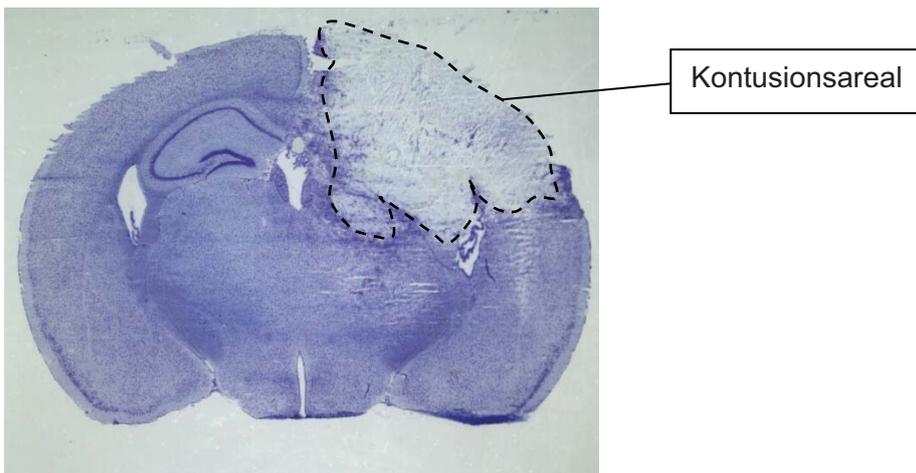


Abbildung 18: Nach Nissl gefärbter Beispielschnitt, die schwarz umrandete Fläche entspricht dem Kontusionsareal

4.4.2.3 Iba-1-Färbung

Die Iba-1-Färbung ist eine Färbung zur Darstellung der aktivierten Mikroglia im Gehirn. Die eingefrorenen 10 µm dicken Hirnschnitte werden zunächst 10 min lang auf dem Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt eine Fixierung mit 4% PFA (Paraformaldehyd) und ein Waschschrift mit PBST (phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X). Durch Zugabe von 5% NGS (Normal Goat Serum Dako, Hamburg, DE) wird eine unspezifische Proteinbindung unterdrückt. Als nächster Schritt erfolgt die Auftragung des Primärantikörpers (Anti Iba-1, Rabbit Wako: 019-19741, WAKO Chemicals, Neuss, DE) (1:1500 in PBST mit 0,5% NGS), der über Nacht in das Gewebe einwirkt. Die Lagerung der Hirnschnitte erfolgt über Nacht in einer feuchten Kammer. Um alle nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wird ein dreimaliges Waschen in PBST durchgeführt. Der Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame, USA) (biotinylierter Anti-rabbit-IgG (H+L), 1:50 verdünnt mit PBST + 0,5% NGS) wird auf die Schnitte aufgetragen und hat eine 90-minütige Inkubationszeit. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBST wird der ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, AXXORA, Burlingame, CA, USA) auf die Schnitte geträufelt und 1 h inkubiert. Die im ABC-Komplex enthaltene, an Avidin- und Biotin-konjugierte Peroxidase dient der Signalverstärkung des Sekundärantikörpers. Nach dem darauf folgenden Waschschrift mit PBST wird das Chromogen in Form von Diaminobenzidin (DAB) (DAKO, Hamburg, DE) für exakt 90 sec auf die Schnitte gegeben. Daraufhin folgen drei weitere Waschvorgänge; zwei mit PBST, einer mit Aqua dest. (Braun, Melsungen, DE). Anschließend wird eine Gegenfärbung mit purer Hämalaun-Lösung (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, DE) für 90 sec durchgeführt. Abschließend folgt ein fünf-minütiger Waschschrift mit Leitungswasser. Nach Beendigung der Färbung werden die Schnitte bei Raumtemperatur 1 h getrocknet und mit Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, DE) und Deckgläschen (Diagonal, Münster, DE) bedeckt.

4.4.2.4 Bestimmung der Mikrogliazellzahlen

Um die Intensität der Mikrogliaaktivierung zwischen den Versuchsgruppen vergleichen zu können, werden die angefärbten Mikrogliazellen gezählt, sie nehmen durch die Iba-1-Färbung eine dunkelbraune Farbe an. Die Auszählung dieser Zellen erfolgt in der ipsilateralen Hemisphäre im perikontusionalen Bereich auf einer Fläche von 0,3 x 0,8 mm. Auch in der contralateralen Hemisphäre wird die Mikroglia ausgezählt in einem Feld, das spiegelbildlich zu dem ausgezählten Feld der ipsilateralen Hemisphäre liegt (Spiegelbildachse: Trennungslinie der Hemisphären) (Abb. 19). Die Zählung der Mikroglia erfolgt an drei aufeinander folgenden Ebenen, Schnittebene 11, 12 und 13. Diese entsprechen dem Ge-

hirnbereich, in dem das Kontusionsvolumen am größten ist. Durch Addition der Einzelzellzahlen in der ipsilateralen Hemisphäre wird eine Gesamtzellzahl bestimmt. Gleichmaßen wird mit der contralateralen Seite verfahren.

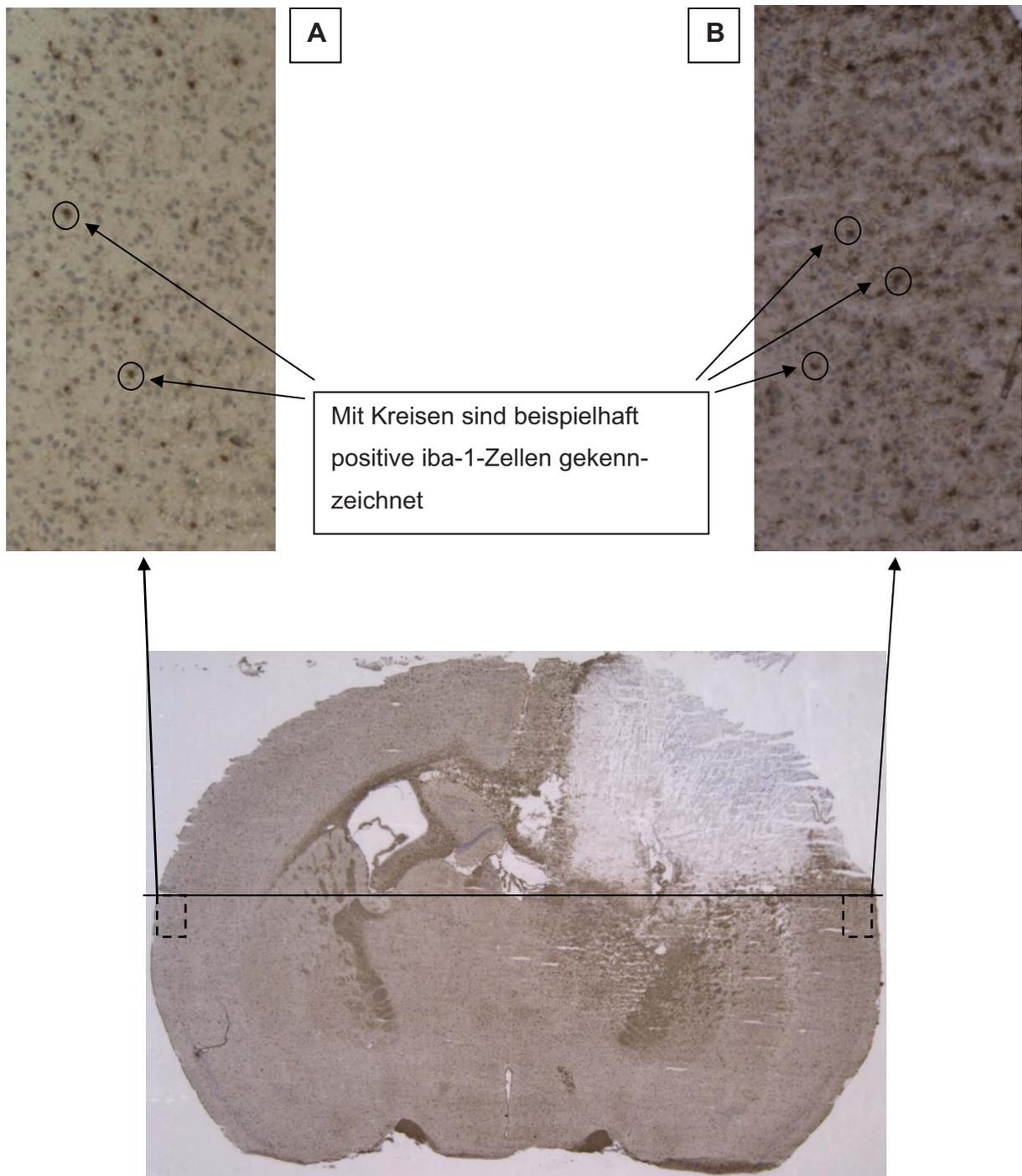


Abbildung 19: Iba-1 gefärbter Beispielschnitt (die gestrichelten Umrahmungen stellen Felder dar, in denen die Auszählung der Mikroglia erfolgt, A: Vergrößerung des ausgezählten Feldes in contralateraler Hemisphäre; B: Vergrößerung des ausgezählten Feldes in ipsilateraler Hemisphäre)

4.4.2.5 IgG-Färbung

Mithilfe der IgG-Färbung kann die Störung der BHS an einem histologischen Gehirnschnitt sichtbar gemacht werden. An den Stellen des Gehirns, an denen die BHS aufgrund des SHT durchlässig wird, tritt IgG aus den Gefäßen aus. An diesen können sich IgG-Antikörper anlagern, was die Gehirnstellen dunkelbraun verfärbt. Anhand eines Beispielschnittes soll der Bereich der geöffneten BHS dargestellt werden (Abb. 20).

Zur Herstellung der IgG-gefärbten Schnitte werden die Hirnschnitte nach einer zehnminütigen Trocknungsphase für 15 min mit 4% PFA fixiert. Anschließend wird nach einer zehnminütigen Spülung mit PBST, der Antikörper (Biotinylated anti-mouse IgG (H+L), Vector Laboratories, Burlingame, USA) mit PBST auf die Schnitte gegeben; er wirkt über Nacht ein. Am folgenden Tag erfolgen zwei Waschschrte mit PBST. Im weiteren Vorgehen werden die Schnitte für 1 h mit ABC-Komplex (AXXORA, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert; daraufhin wird dreimalig mit PBST gespült. Weiterhin wird mit DAB (DAKO, Hamburg, DE) für 90 sec angefärbt. Auf die DAB-Färbung folgen zwei weitere PBST-Waschschrte, ein fünfminütiges Waschen mit Aqua dest. (Braun, Melsungen, DE) und eine einstündige Trocknungsphase. Darauffolgend werden die Präparate mit Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, DE) und Deckgläschen (Diagonal, Münster, DE) versehen zum Schutz der Schnitte.



Abbildung 20: IgG gefärbter Beispielschnitt, schwarz umrandete Fläche entspricht dem Areal mit gestörter BHS

4.5 BESTIMMUNG DER PHYSIOLOGISCHEN PARAMETER: FUTTERAUFNAHME UND TÄGLICHES KÖRPERGEWICHT

Um die Futteraufnahme der Mäuse zu ermitteln, wird jeder Maus täglich eine Futtermenge von drei Pellets (ssniff, Soest, DE) in einer Käfigecke in einem flachen Schälchen zur Verfügung gestellt. Diese Futtermenge ist vorgetrocknet, um eventuelle Feuchtigkeitsunterschiede des Futters und davon abhängige Gewichtsunterschiede zu minimieren. Die kontrollierte Fütterung der Mäuse beginnt 24 h vor der OP, um die präoperativ gefressene Futtermenge zu ermitteln. Nach Entnahme des Restfutters aus dem Käfig wird auch dieses zuerst getrocknet, um eventuelle Feuchtigkeitsunterschiede auszugleichen, und dann gewogen. Die aufgenommene Futtermenge ermittelt sich aus der Differenz zwischen den Gewichten der frischen Pellets (ssniff Soest, DE) und der Restfuttermenge.

Das Körpergewicht jeder Maus wird an jedem Tag gewogen. Das Körpergewicht wird im Ergebnisteil in Prozent des präoperativen Ausgangsgewichts angegeben.

Um die Futteraufnahme der Mäuse untereinander besser vergleichen zu können, wird die Futtermenge ermittelt, die täglich „pro 1g Körpergewicht“ aufgenommen wird:

$$\text{pro 1g Körpergewicht Futtermenge} = \frac{\text{Tagesfuttermenge}}{\text{aktuelles Körpergewicht}}$$

4.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.6.1 RIBONUKLEINSÄURE-ISOLIERUNG

Mithilfe des mi Rneasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, DE) wird die RNA aus den Hippocampus-Proben vollständig isoliert.

Zuerst wird die Gewebeprobe mit 0,7 ml Qiazol-Reagenz (Qiagen, Hilden, DE) im Mastermill (MM 300, Retsch, Haan, DE) bei 20 Hertz (Hz) für zwei Minuten mit einer Edelstahlkugel zerkleinert und die entstandene Mischung anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert: Eine Lysierung des Gehirnmaterials tritt ein; zudem findet eine Inaktivierung und Denaturierung der Proteine durch die im Qiazol (Qiagen, Hilden, DE) enthaltene Guanidinisothiocyanat-Lösung statt. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, München, DE) wird die entstandene Mischung für 15 sec auf dem Laborschüttler (Vortex, Reax control, Heidolph, Hamburg, DE) gemischt. Die entstandene Mixtur wird anschließend für zwei weitere min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Probe bei 4 °C 12000 x g-Kraft zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, DE).

Durch die Zentrifugalkraft teilt sich die Probe in drei Phasen: Eine obere farblose wässrige Phase, eine mittlere milchige Interphase sowie eine rote organische untere Phase. Die obere Phase beinhaltet die RNA und umfasst ca. 600 µl. Sie wird zur weiteren Aufarbeitung der RNA verwendet.

Die obere wässrige Phase wird zur Aufbereitung der RNA abpipettiert; ihr werden 525 µl 100% Ethanol (Roth, Kalsruhe, DE) zugegeben. Nach gründlichem Mischen im Vortex (Reax control Heidolph, Hamburg, DE) wird die Probe auf eine Mini-Spin-Säule (Qiagen, Hilden, DE) aufgetragen und bei Raumtemperatur 15 sec lang mit 10.000 x g-Kraft zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, DE). Eine Zugabe von Ethanol bewirkt die Bildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den RNA-Molekülen und den OH-Gruppen der Silikatmembran. Es kommt zu einer selektiven Bindung der RNA an die Silikatmembran der Säule (Qiagen, Hilden, DE).

Im nächsten Schritt werden 350 µl RWT-Puffer (Qiagen, Hilden, DE) auf die Säule (Qiagen, Hilden, DE) pipettiert und für 15 sec bei 10.000 x g-Kraft zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, DE). Durch Zugabe von 80 µl DNase-Mix (610 µl RDD-Puffer + 80 µl DNase (Qiagen, Hilden, DE) erfolgt auf der Säule (Qiagen, Hilden, DE) ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, DE). Die Kontaminationsgefahr durch verbliebene genomische DNA wird durch diesen Schritt weiter minimiert.

Anschließend folgen drei Waschungen zur Reinigung der RNA: im ersten Durchlauf mit 350 µl RWT-Puffer (Qiagen, Hilden, DE), in den beiden folgenden mit jeweils 500 µl RPE Puffer (Qiagen, Hilden, DE).

Alle Waschschriffe werden mit einer Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, DE) von jeweils 15 sec bei 10.000 x g-Kraft durchgeföhrt. Der letzte Puffer-Waschgang dauert zwei Minuten. Die in den Waschschriffen entstandenen Durchläufe werden verworfen. Anschließend folgt ein Trocknungsschritt der Spin-Säule (Qiagen, Hilden, DE), der durch Zentrifugation in der Minizentrifuge (VWR, Mini Star silverline, Kinetic energy Joules) bei maximaler Geschwindigkeit durchgeföhrt wird.

Gemäß dem Qiagen-Protokoll wird die Eluierung der RNA durchgeföhrt. Bei diesem Vorgang werden 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und eine Minute bei 10.000 x g-Kraft abzentrifugiert. Zwei Elutionen werden auf diese Weise durchgeföhrt, um den Rest der gebundenen RNA zu erhalten. Die eluierte RNA wird bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C eingefroren. Dieser Vorgang wird an einem speziell gesäuberten RNA-Arbeitsplatz mithilfe von RNase- und DNase-freiem oder sterilem Einwegmaterial durchgeföhrt.

4.6.2 RIBONUKLEINSÄURE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MITTELS PHOTOMETER

Für die Herstellung der cDNA (komplementäre DNA) wird stets die gleiche Menge RNA eingesetzt. Um diese Menge festlegen zu können, erfolgt die Messung der RNA-Konzentration (µg/µl) der isolierten RNA-Proben mittels Photometer (Nano Vue, GE Healthcare, DE). Zur Ermittlung der RNA-Konzentration wird die optische Dichte (OD) der RNA-Probe bei 260 nm und 280 nm photometrisch gemessen.

Um die Reinheit der RNA zu bestimmen, wird die OD der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Diese beiden Wellenlängen sind deshalb gewählt, weil das RNA-Absorptionsmaximum aufgrund von aromatischen Heterozyklen der Nukleinsäurebasen bei 260 nm liegt und das von Proteinen durch aromatische Aminosäuren bei 280 nm.

Als Reinheitsgrad wird der Quotient $\frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}}$ verwendet. Nicht kontaminierte Proben weisen einen Reinheits-Quotienten von 1,8 - 2,1 auf.

Die OD 260 von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von etwa 40 µg/ml. Demzufolge berechnet das Photometer die RNA-Konzentration der Probe mit folgender Formel:

$$c = OD_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40[\mu\text{g/ml}]$$

4.6.3 cDNA-SYNTHESE

Um die in den Proben vorhandene RNA in cDNA umzuwandeln, wird eine cDNA-Synthese oder reverse Transkription benutzt. Die verwendete reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA als Matrize verwendet. Die Polymerase lagert sich an den RNA-Strang an und bildet zu diesem einen komplementären DNA-Strang. Der RNA-DNA-Strang wird durch eine Realtime-Polymerase hydrolysiert und trennt sich.

Die cDNA-Synthese wird mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, DE) laut Herstellerprotokoll ausgeführt. Die Reaktionen werden auf Eis durchgeführt, um einen RNA-Abbau zu reduzieren. Das Verfahren besteht aus zwei Schritten: Erst wird die genomische DNA eliminiert, um etwaige Kontaminationen zu minimieren, darauffolgend eine reverse Transkription durchgeführt. Nach der reversen Transkription laut Herstellerprotokoll wird der Ansatz bei -80°C eingefroren.

4.6.4 POLYMERASEKETTENREAKTION-ANALYSE

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um DNA in vitro zu amplifizieren. Durchgeführt wird die PCR im LightCycler (System, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE), welcher den Temperaturablauf eines jeden Durchganges genau steuert. Durch eine zyklische Wiederholung der im PCR-Protokoll vorhandenen Reaktionsschemata wird DNA exponentiell vermehrt. Der festgelegte Abschnitt auf der DNA, der amplifiziert werden soll, wird durch die Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-Primer (ca. 20 Nukleotide) festgelegt. Für jedes Gen, dessen Expression untersucht werden soll, wird ein eigenes Primerpaar eingesetzt (verwendete Primer siehe Tabelle 8). Dieses Primerpaar bindet an den zu untersuchenden Abschnitt des Gens. Die dadurch markierte Stelle auf dem Gen dient als Ansatzstelle der DNA-Polymerasen, welche die DNA amplifizieren.

Im ersten Schritt eines jeden Zyklus wird die doppelsträngige DNA auf $90 - 95^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die dadurch entstehende Denaturierung führt dazu, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen der DNA-Stränge getrennt werden: Der DNA-Strang liegt in Einzelsträngen vor. Nach Abkühlung der Probe erfolgt eine Anlagerung der hinzugegebenen Primer an die Einzelstränge. Die Primer bestehen aus synthetischen Oligonukleotiden und dienen als Startermoleküle der DNA-Synthese. An die am Ende jedes Einzelstranges angeetzten Primer werden mithilfe der DNA-Polymerase die komplementären Nukleotide angebaut, die im Reaktionsmedium im Überschuss vorhanden sind. Durch mehrmaliges Durchführen dieses Reaktionsablaufes wird die DNA selektiv amplifiziert.

4.6.5 QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR (QPCR)

Die Bestimmung der Menge des zu untersuchenden Markergens wird mit der quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt. In dieser Methode werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden (verwendete Sonden siehe Tabelle 9) eingesetzt, um die amplifizierten DNA-Abschnitt farblich zu markieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch eine Lichtquelle angeregt. Das sich daraus ergebende Signal korreliert quantitativ mit der Menge an PCR-Produkten und kann mithilfe einer Software in Echtzeit (real time) visualisiert werden.

Nach Erstellen einer Kurve, in der man die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die PCR Zykluszahl aufträgt, erhält man einen wie in Abb. 21 dargestellten Kurvenverlauf. Dieser kann in drei Bereiche gegliedert werden: eine Anfangsphase, eine exponentielle Wachstumsphase, und eine Plateauphase. In der Wachstumsphase gibt es einen quantitativen Anstieg des Fluoreszenzsignals. In der Plateauphase wächst die Fluoreszenz nicht mehr an. Mithilfe der Daten in der Wachstumsphase wird die Produktmenge ermittelt. Dafür werden sogenannte Crossingpoints von dem LightCycler bestimmt, die an der Stelle der Kurve liegen, an dem das Fluoreszenzsignal der Probe signifikant einen Schwellenwert überschreitet. Der Wert der Crossingpoints entspricht der Zykluszahl. Mithilfe des Crossingpoints berechnet der LightCycler (System, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE) die Menge der enthaltenen cDNA in der Probe.

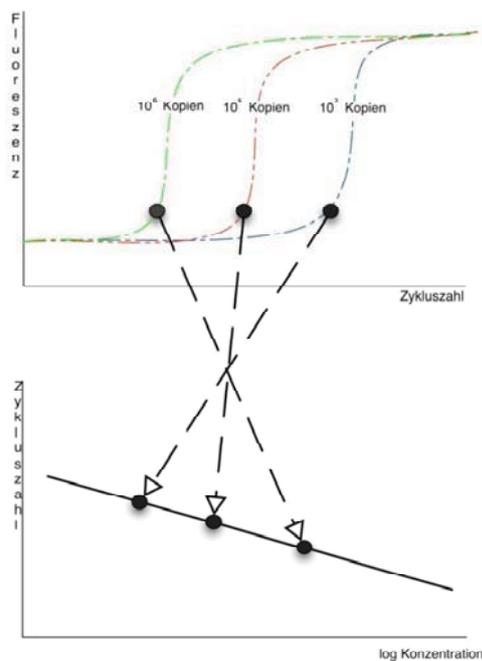


Abbildung 21: Drei Fluoreszenzkurven einer Verdünnungsreihe (oben) und die resultierenden Crossingpoints auf der Regressionsgeraden (unten)(52)

4.6.6 POLYMERASEKETTENREAKTION STANDARD-GENERIERUNG FÜR DIE QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR

Um von der cDNA-Menge auf die RNA-Menge schließen zu können, wird ein sogenannter Standard benötigt. Dieser Standard ist eine beliebige cDNA-Probe, deren Konzentration bekannt ist und welche die gesuchte Sequenz des Zielgens beinhaltet.

Aus dieser Probe wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, die in der PCR mitläuft. Mithilfe dieser Werte kann eine Standardkurve erstellt werden, über die die Ausgangskonzentrationen der in der Studie eingesetzten Proben ermittelt werden können.

Die Expressionsberechnung der Entzündungsparameter IL-6, COX-2 und iNOS erfolgt mit der LightCycler Software (Light Cycler Software Version 4.5, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE). Die ermittelten Expressionsdaten werden gegen das Housekeeping Gen Cyclophilin-A normalisiert gemessen und angegeben, um die unterschiedliche Effizienz der reversen Transkription und RNA-Messfehler zu korrigieren.

4.7 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG

Die Daten werden entweder in Form eines Box-Plots oder im Balkendiagramm veranschaulicht. Im Balkendiagramm wird der Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts angegeben. Die statistische Datenauswertung sowie die Erstellung der graphischen Abb. wird mit dem Programm Sigma Plot 11.0 durchgeführt. Die p-Werte $< 0,05$ werden als statistisch signifikant angesehen. Alle Daten werden vor Anwendung eines Tests von Sigma Plot 11.0 auf Normalverteilung und Varianzhomogenität mit Hilfe des Shapiro-Wilk und Equal Variance-Test untersucht. Die Bonferroni-Holm-Korrektur wird für die gesamte Auswertung zur Adjustierung multipler Tests verwendet.

Der Vergleich der Versuchsgruppen des HW-Gehalts wird mit dem One Way Analysis of Variance (One Way Anova)-Test durchgeführt. Beim Vergleich von ipsilateraler und contralateraler Hemisphäre wird der gepaarte T-Test verwendet.

Zur Analyse des histologischen Schadens werden die Versuchsgruppen mit dem One Way Anova-Test verglichen.

Die Zahl iba-1 reaktiver Mikrogliazellen in jeweils einer Hemisphäre wird mit dem One Way Anova untersucht. Der Interhemisphärenvergleich erfolgt mit dem gepaarten T-Test, nachdem Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft sind.

Die physiologischen Daten der Gruppen werden, wenn verschiedene Zeitpunkte vorhanden sind, für jeden Beobachtungszeitpunkt einzeln betrachtet. Die Daten der physiologischen Parameter werden beim Vergleich mehrerer Gruppen mit dem Kruskal Wallis One Way Anova on Ranks-Test untersucht. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgt mit dem Mann-Whitney Rank-Sum-Test. Die molekularbiochemischen Parameter werden beim Vergleich von zwei Gruppen ebenfalls mit dem Mann Whitney Rank-Sum-Test untersucht. Mehrere Gruppen werden mit dem Kruskal-Wallis One Way Anova on Ranks getestet.

Zur Analyse der Score-Systeme werden die Versuchsgruppen des CCI-Versuchs mit dem Kruskal Wallis One Way Anova on Ranks-Test verglichen. Beim Vergleich der operierten mit den sham-operierten Gruppen erfolgt eine Anwendung des Mann-Whitney Rank-Sum-Tests. Bei der fünftägigen Studie werden die Werte jeweils an den einzelnen Tagen verglichen. Der KS der SAB-Versuchsgruppen mit dem Mann Whitney Rank-Sum und dem Kruskal Wallis One Way Anova on Ranks getestet.

4.8 SCORE-SYSTEME

Ein Score-System wird in der vorliegenden Studie verwendet, um neurologische Defizite und Schmerzlevel der Mäuse zu ermitteln. Ein Score-System ist eine Tabelle, in der die Ausprägung verschiedener Parameter mithilfe von Punkten gezählt wird. Die erreichte Gesamtpunktzahl gibt Auskunft über den neurologischen Status bzw. den Schmerz-Status der Maus zum Untersuchungszeitpunkt. Der neurologische bzw. Schmerz-Status kann auch als „Outcome“ bezeichnet werden. Das „Outcome“ der Tiere, welches durch die Anwendung von Score-Systemen erfasst wird, gilt als entscheidender Parameter zur Ermittlung der Effizienz einer Therapie (139). Dabei werden in dieser Studie zwei Arten von Scores angewendet: Der NS dient der Ermittlung neurologischer Defizite, während der KS eine Aussage über das Wohlbefinden und den Schmerzlevel der Tiere ermöglicht. Beide Scores – im Folgenden vorgestellt – werden präoperativ sowie postoperativ bei jeder Maus durchgeführt.

4.8.1 NEUROSCORE

Um ein besseres Bild über die neurologischen Ausfälle der Maus zu erhalten, werden bei jeder Maus sowohl präoperativ als auch postoperativ bestimmte neurologische Tests durchgeführt. Tiere, die eine Überlebenszeit von 24 h aufweisen, werden präoperativ sowie kurz vor der Tötung gescort. Bei einer Überlebenszeit von 5 d erfolgt ein Scoring präoperativ sowie an den Tagen 1, 3 und 5. Für jede neurologische Auffälligkeit werden Score-Punkte vergeben (siehe Tabelle 12). Die Punkte werden am Ende addiert und ergeben eine NS-Gesamtpunktzahl. Im Weiteren erfolgt die Vorstellung der einzelnen NS-Parameter:

Als erstes werden die Tast-Schnurr-Haar-Bewegung und die Reaktion der Maus auf lautes Händeklatschen beobachtet. Das ermöglicht Rückschlüsse auf craniale Nervenfunktionen, wie z.B. das Gehör. Zusätzlich wird die Fähigkeit der Maus, zu schnüffeln und so ihre Tasthaare zu bewegen, beurteilt. Durch Beobachtung der Laufbewegung der Maus auf gerader Fläche erfolgt eine Ermittlung möglicher motorischer Defizite der Gliedmaßen.

Für die Koordinationsprüfung wird der sogenannte Beam-Walking-Test verwendet, bei dem die Maus nacheinander über drei verschieden breite Balken (3 cm, 1,5 cm, 1 cm) laufen muss. Je nach Ausprägung neurologischer Defizite kann die Maus entweder problemlos über den Balken laufen, weist Fehlritte auf, bleibt auf dem Balken sitzen oder fällt vom Balken.

Der Placing-Test prüft, ob die Maus den Versuch unternimmt, ihre Vorderpfoten auf den Boden zu setzen, wenn sie am Schwanz hochgehoben wird. Dieser Reflex sollte physiologisch vorhanden sein. Ein Fehlen dieses Reflexes weist auf einen Sensibilitätsverlust oder eine

motorische Störung der Vordergliedmaßen des Tieres hin. Ein „Zirkeln“ der Maus – spontan oder nach Anheben am Schwanz – ist ein Indiz für eine einseitige Ischämie: Die Maus ist nicht fähig, die kontralaterale Körperseite kontrolliert zu bewegen – in der nachfolgenden Tabelle ist der ausführliche NS mit Unterpunkten dargestellt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Neuroscore. Modifiziert nach Thal 2009 (140)

Neuroscore			Prä OP	24 h	3 d	5 d
Reflexe Cranial-Nerven						
Tasthaar (Bewegung)	vorhanden	(0)				
	nicht vorhanden	(1)				
Gehör (Maus reagiert beim Händeklatschen)	vorhanden	(0)				
	nicht vorhanden	(2)				
Motorische Defizite						
li. Vorderbein Bewegung	normal	(0)				
	steif	(1)				
	gelähmt	(2)				
re. Vorderbein Bewegung	normal	(0)				
	steif	(1)				
	gelähmt	(2)				
li. Hinterbein Bewegung	normal	(0)				
	steif	(1)				
	gelähmt	(2)				
re. Hinterbein Bewegung	normal	(0)				
	steif	(1)				
	gelähmt	(2)				
Koordination						
Balken 3 cm	Score	(0-4)				
Balken 1,5 cm	Score	(0-4)				
Balken 1 cm	Score	(0-4)				

Kriterien: 0 Pkte: normale Bewegung / keine Beeinträchtigung 1 Pkt: Fuß Fehlritte/ un stabile Bewegung 2 Pkte: sitzt hin / bleibt auf Balken stehen 3 Pkte: fällt runter nach ein paar Tritten 4 Pkte: fällt sofort vom Balken						
Platzierungstest ¹⁾	vorhanden	(0)				
	nicht	(1)				
¹⁾ Vorderfüße platzieren sich korrekt auf den Boden, wenn Maus am Schwanz angehoben wird.						
Zirkeln und Widerstandsfähigkeit						
reduzierter Widerstand von der Seite		(2)				
„zirkelt“ wenn man sie am Schwanz hoch hält		(3)				
“zirkelt” spontan		(4)				
keine Spontanbewegung		(5)				
Gesamtpunktzahl:						

4.8.2 KOMFORTSCORE

Die Maus zählt in der Natur zu den Beutetieren, deswegen zeigt sie Schmerzen nur geringfügig. Das erschwert die Beurteilung von Schmerzen nach einem Eingriff (6). Eine Beurteilung ist aber grundsätzlich nicht unmöglich. Mithilfe des KS werden Rückschlüsse über das Wohlbefinden der Maus gezogen, die einen Hinweis auf den jeweiligen Schmerzlevel der Maus geben. Der verwendete KS (Tabelle 13) in seiner nicht erweiterten Fassung wurde von **Adamson et al.** 2010 schon in der „*Assessment of carprofen and buprenorphine on recovery of mice after surgical removal of the mammary fat pad*“-Studie bei Mäusen eingesetzt (2). Die Einzelparameter des Scores von Adamson werden auch von anderen Forschern, die sich mit Schmerzdetection beim Tier befassen, verwendet. Da Adamson und Kollegen lediglich eine geringe Anzahl an Parametern in ihren Score aufgenommen haben und diese Anzahl nicht ausreichte, um einen Unterschied zwischen therapierten und nicht-therapierten Gruppen zu zeigen, wurde der Score für die vorliegende Studie erweitert und die Parameteranzahl verdoppelt.

Die Punkte im KS werden folgendermaßen ermittelt: Es werden Verhaltensweisen beurteilt, die auf das Wohlbefinden der Maus schließen lassen. Liegt eine Veränderung der physiologischen Verhaltensweise vor, erhält die Maus je nach Ausprägung der Veränderung eine Punkteanzahl im Score.

Der erste zu beurteilende Parameter ist das Nestbauverhalten der Maus: Jeder Maus steht ein Papierhandtuch zur Verfügung, mit dem sie ein Nest bauen kann. Normalerweise bauen Mäuse nach spätestens 24 h Aufenthalt in ihrem Käfig mit dem Papierhandtuch ein Nest. Gesunde Mäuse zernagen das Handtuch in Stücke oder knüllen es in ein rundes nestartiges Gebilde; leicht beeinträchtigte Mäuse benutzen das Papierhandtuch zwar als Schutz und verstecken sich darunter, formen es aber nicht mehr. In ihrem Verhalten stark beeinträchtigte Mäuse verwenden das Papierhandtuch gar nicht.

Weitere auf Schmerz hindeutende Faktoren sind das Zähneknirschen und permanent ausgeufene Vokalisation. Ausschließlich Tiere mit einem hochgradig gestörten Allgemeinbefinden äußern diese.

Jedes gesunde schmerzfreie Tier betreibt Körper- und Fellpflege. Treten bei einem Tier Schmerzen auf, vernachlässigt es diese. Die Fellpflegeaktivität wird im vorliegenden KS anhand des Haarkleides betrachtet.

Für die Maus als Beutetier ist es von großer Bedeutung, wachsam zu sein, um zu überleben. Erst bei starken Schmerzen oder hochgradiger Allgemienstörung wird diese überlebensnot-

wendige Eigenschaft – Wachsamkeit – abgelegt. Die Öffnung der Augen und damit die Fähigkeit, ihre Umwelt wahrzunehmen, ist ein weiteres Kriterium des KS.

Ein weiterer im KS beachteter Parameter ist die Körperhaltung der Maus. Vor allem in der Tiermedizin sind Körperhaltung und Bewegungsablauf ein wichtiges Instrument, um eventuelle Schmerzhaftigkeiten der Tiere zu beobachten. Zusammenkrümmung sowie reduzierter Bewegungsdrang sind Hinweise auf schmerzhafte Prozesse.

Als zusätzlicher Parameter wird das Verhalten der Mäuse beobachtet. Es wird beurteilt, ob sich die Maus in irgendeiner Weise auffällig verhält: Die Erscheinung der Maus wird abgestuft von normal bis hochgradig depressiv.

Der Dehydratationsgrad ist ein Parameter, mit dem indirekt die Wasseraufnahme der Tiere bestimmt werden kann. Da bei dem verwendeten Trinkflaschensystem keine Wasseraufnahmeermittlung möglich ist, wird der Dehydratationsgrad der Maus indirekt ermittelt: Das geschieht anhand der Dauer, die eine Hautfalte am Rücken der Mäuse vom Anheben bis zum Verstreichen benötigt.

Tabelle 13: Komfortscore. Modifiziert nach Adamson 2010 (2)

Komfortscore	Punkte	Prä OP	24 h	3 d	5 d
Nestbau					
normales Nest	(0)				
Papierhandtuch benutzt	(1)				
Papierhandtuch nicht benutzt	(2)				
Zähneknirschen					
nein	(0)				
ja	(2)				
Andere wimmernde Pieps-Geräusche					
nein	(0)				
ja	(2)				
Haarkleid					
normal, gut gepflegt, glatt, glänzend	(0)				
schlecht gepflegt	(2)				
ungepflegtes Haarkleid, schmutzige Erscheinung	(4)				
sehr ungepflegtes Haarkleid, schmutzig verklebtes Fell	(6)				
Augen					

Offen, aufmerksam	(0)				
zugekniffen	(2)				
geschlossen	(4)				
Koordination und Haltung					
normal	(0)				
läuft komisch oder leicht gekrümmt	(1)				
rennt und bewegt sich	(2)				
läuft gekrümmt, läuft langsam und mühevoll, rennt manchmal	(3)				
läuft langsam und mühevoll und rennt nie	(4)				
gekrümmt, stolpert bei Bewegung	(5)				
gekrümmt, keine Bewegung	(6)				
Insgesamtes Befinden					
normal	(0)				
ungepflegte Erscheinung, normales Verhalten	(1)				
ungepflegte Erscheinung, leicht depressiv	(2)				
ungepflegte Erscheinung und sehr depressiv	(3)				
Austrocknung					
Hautfalte steht > 2 sec	(4)				
Hautfalte steht > 1 sec	(2)				
Hautfalte verstreicht sofort	(0)				
Gesamtpunktzahl:					

5 ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Studie aufgelistet und beschrieben. Zunächst wird auf den HW-Gehalt eingegangen. Dann folgt die Darstellung der Ergebnisse der histologisch ausgewerteten Hirnschnitte. Diese beinhalten das Kontusionsvolumen, welches mithilfe der Nissl-Färbung ermittelt wurde, sowie die aktivierte Mikroglia, die mit der Iba-1-Färbung gefärbt wurde. Daraufhin wird auf die physiologischen Parameter der Mäuse, das Körpergewicht, die Futteraufnahme, die gemessenen Blutparameter sowie die im SAB-Versuch gemessenen Hirndruckwerte eingegangen. Im vorletzten Abschnitt werden die Ergebnisse der molekularbiochemisch ermittelten Inflammationsmarker, der CCI-24 h und SAB-Studie dargelegt; zum Schluss des Kapitels wird auf die Score-Systeme eingegangen, eingeschlossen NS und KS.

5.1 HIRNWASSERGEHALT NACH CCI-24 H

Um die Graphiken des HW-Gehalts in der CCI-24 h-Studie übersichtlicher zu gestalten, werden die CCI-operierten Gruppen getrennt von den Sham-operierten Gruppen in jeweils einer Graphik dargestellt, zuerst die CCI-operierten Tiere (Abb.22) anschließend die Sham-operierten Tiere (Abb. 23).

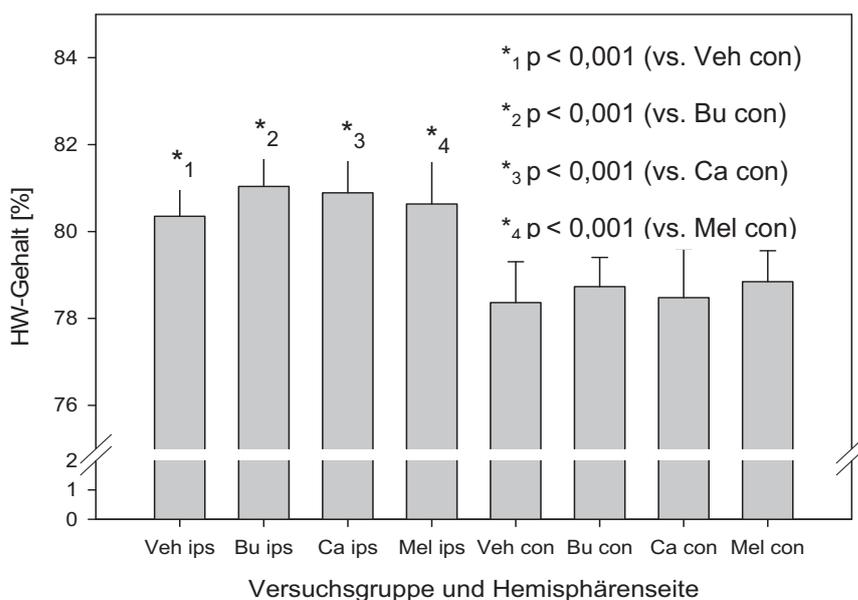


Abbildung 22: CCI 24-h-Studie – HW-Gehalt der CCI-operierten Versuchsgruppen: ipsilaterale Hemisphäre und contralaterale Hemisphäre

Vergleicht man den HW-Gehalt der ipsilateralen Hemisphäre kann zwischen den Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ebenso liegt bei Betrachtung des HW-Gehalts in der contralateralen Hemisphäre kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen vor.

Ein signifikanter Unterschied im HW-Gehalt besteht zwischen ipsilateraler und contralateraler Hemisphäre in jeder Versuchsgruppe. Die ipsilaterale Hemisphäre in welcher der traumatische Schaden hervorgerufen wurde, weist einen jeweils signifikant höheren HW-Gehalt auf als die contralaterale Hemisphäre.

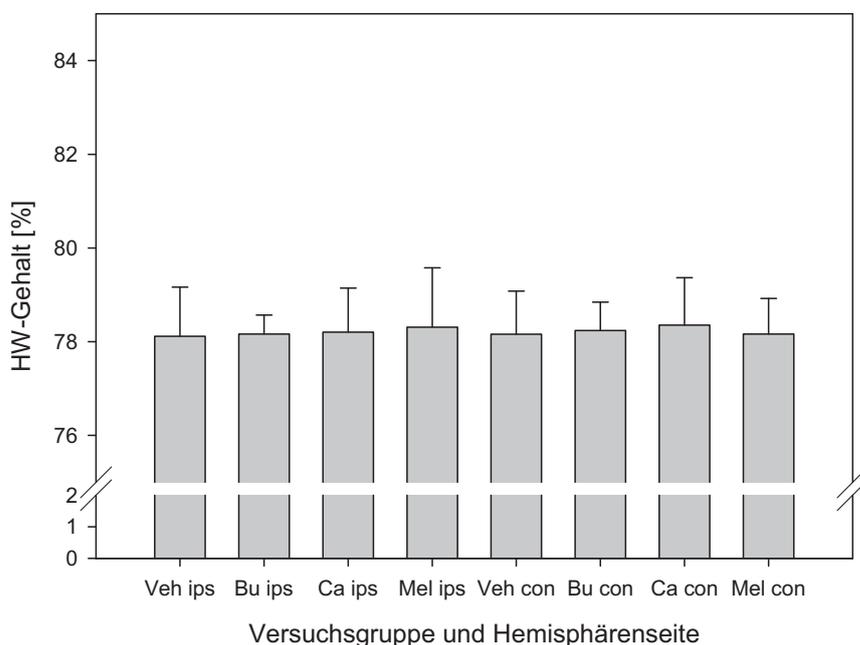


Abbildung 23: CCI-24 h-Studie – HW-Gehalt der Sham-operierten Versuchsgruppen: ipsilaterale Hemisphäre und contralaterale Hemisphäre

Weder in der ipsilateralen noch in der contralateralen Hemisphäre weist der HW-Gehalt der Sham-operierten CCI-Tiere (CCI-24 h) zwischen den Therapiegruppen einen signifikanten Unterschied auf. Der HW-Gehalt einer gesunden nicht therapierten Maus liegt aus Erfahrung in einem vergleichbaren Bereich wie der in Abb. 23 dargestellte HW-Gehalt der Sham-operierten Mäuse.

5.2 HISTOLOGIE

5.2.1 KONTUSIONSOLUMEN FÜNF TAGE NACH CCI – NISSL-FÄRBUNG

Mithilfe der Nissl-Färbung wird quantitativ der histologische Schaden nach SHT bestimmt und zwischen den Versuchsgruppen verglichen (Abb.24).

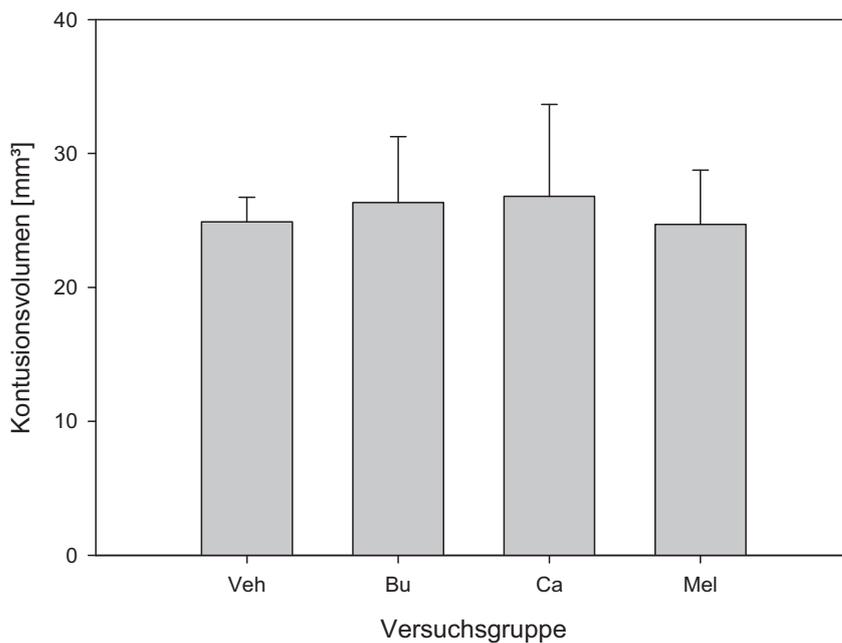


Abbildung 24: CCI-5 d-Studie - Postoperatives Kontusionsvolumen

Das Kontusionsvolumen der analgetisch behandelten Gruppen weist keine signifikante Änderung im Vergleich zur nicht analgetisch therapierten Veh-Gruppe auf. In der Ca-Gruppe liegt eine breite Streuung des Kontusionsvolumens vor. Die Größe der Läsionsfläche in der Ca-Gruppe schwankt zwischen 17 und 35 mm³. Die Verteilung der Schadensgröße in den anderen Versuchsgruppen ist homogener. Histologisch liegt das Kontusionsareal der Versuchsgruppen in gleicher Größenordnung.

Fünf Tiere der CCI-5 d-Studie (3 x Bu, 1 x Mel, 1 x Veh) verstarben vor Abschluss der Studie und wurden aus der Studie ausgeschlossen, dies erfolgte vor Entblindung der Daten.

5.2.2 MIKROGLIA – IBA-1-FÄRBUNG

Die durch die Iba-1-Färbung angefärbten Mikrogliazellen werden – wie im Kapitel 4.4.2.4 erläutert – in drei Gehirnebenen gezählt und für jede Hemisphärenseite addiert. In Abb. 25 sind die ermittelten Werte ipsilateraler und contralateraler Hemisphäre getrennt für alle Versuchsgruppen graphisch dargestellt.

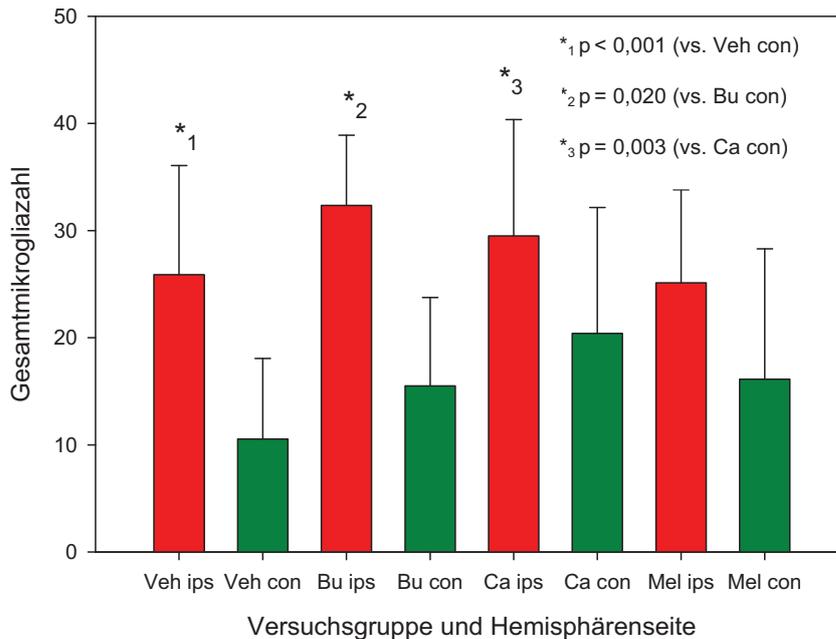


Abbildung 25: CCI-5 d-Studie - Gesamt-mikrogliazahl der ausgezählten Felder rot: ipsilaterale Hemisphäre; grün: contralaterale Hemisphäre

In Abb. 25 zeigen die roten Balken die Mikrogliazahlen der ipsilateralen Hemisphäre, die grünen Balken die Mikrogliazahlen der contralateralen Hemisphäre. Vergleicht man die Mikrogliazahlen der ipsilateralen Hemisphäre, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. In der contralateralen Hemisphärenseite (grüne Balken) ist ebenfalls kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zu sehen. Damit ist in keiner Hemisphäre ein Effekt auf die Mikrogliazahl durch analgetische Therapie zu sehen.

Die Schädigung des Gehirns durch CCI löst eine Mikrogliaaktivierung aus. Aus diesem Grund ist eine höhere Mikrogliazahl in der ipsilateralen im Vergleich zur contralateralen Hemisphäre zu erwarten. In allen Versuchsgruppen ist die Mikrogliazahl in ipsilateralen Hemisphäre größer als in contralateralen; bei der Veh-, Bu- und Ca-Gruppe liegt ein signifikanter Unterschied vor.

5.3 PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

In vorliegender Studie wurden die physiologischen Parameter tägliches Körpergewicht, tägliche Futterraufnahme sowie prämortale Blutwerte gemessen. Körpergewicht und tägliche Futterraufnahme geben neben dem KS Aufschluss über Schmerzlevel und Wohlbefinden der Tiere – in den folgenden drei Abschnitten werden die Ergebnisse der genannten physiologischen Parameter in allen drei Studien aufgelistet und beschrieben.

5.3.1 KÖRPERGEWICHT

Das Körpergewicht wird in der CCI-24 h-Studie lediglich bei den CCI-operierten Tieren dargestellt, da die Sham-operierten Tiere keinen nennenswerten Veränderungen in ihrem Körpergewicht zeigen.

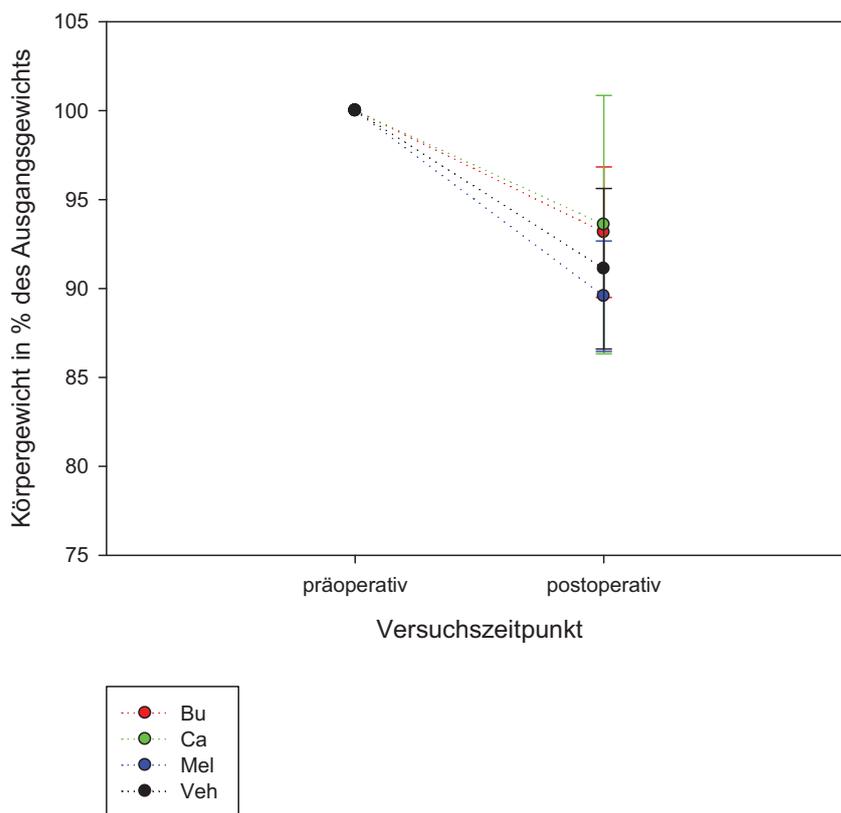


Abbildung 26: CCI-24 h-Studie - Körpergewichte in % des Ausgangsgewichts der CCI-operierten Mäuse

Wie Abb. 26 zeigt, weisen alle CCI-operierten Mäuse der CCI-24 h-Studie postoperativ einen Körpergewichtsverlust auf; wobei am postoperativen Versuchstag zwischen den Versuchsgruppen kein klinisch relevanter Unterschied vorliegt. Alle CCI-operierten Mäuse verlieren durchschnittlich ca. 10% ihres Körpergewichts.

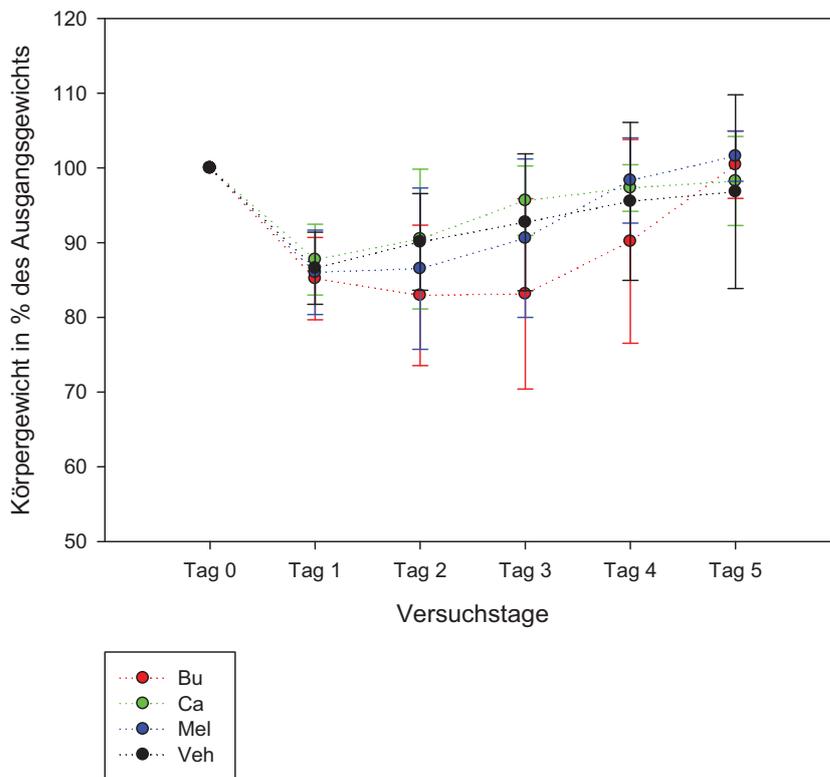


Abbildung 27: CCI-5 d-Studie - Tägliche Körpergewichte der Mäuse in % des Ausgangsgewichts

In Abb. 27 ist das tägliche Körpergewicht der CCI-5 d-Tiere in ihren Versuchsgruppen graphisch veranschaulicht. Im täglichen Vergleich aller Versuchsgruppen besteht zwischen der Veh-Gruppe und den therapierten Versuchsgruppen an keinem Tag ein signifikanter Unterschied. Die mit Carprofen therapierte Gruppe verliert im Vergleich zu der mit Buprenorphin therapierten Gruppe signifikant weniger an Gewicht ($p = 0,014$). Alle Versuchstiere der CCI-5 d-Studie erreichen am fünften Tag wieder annähernd ihr ursprüngliches Ausgangsgewicht.

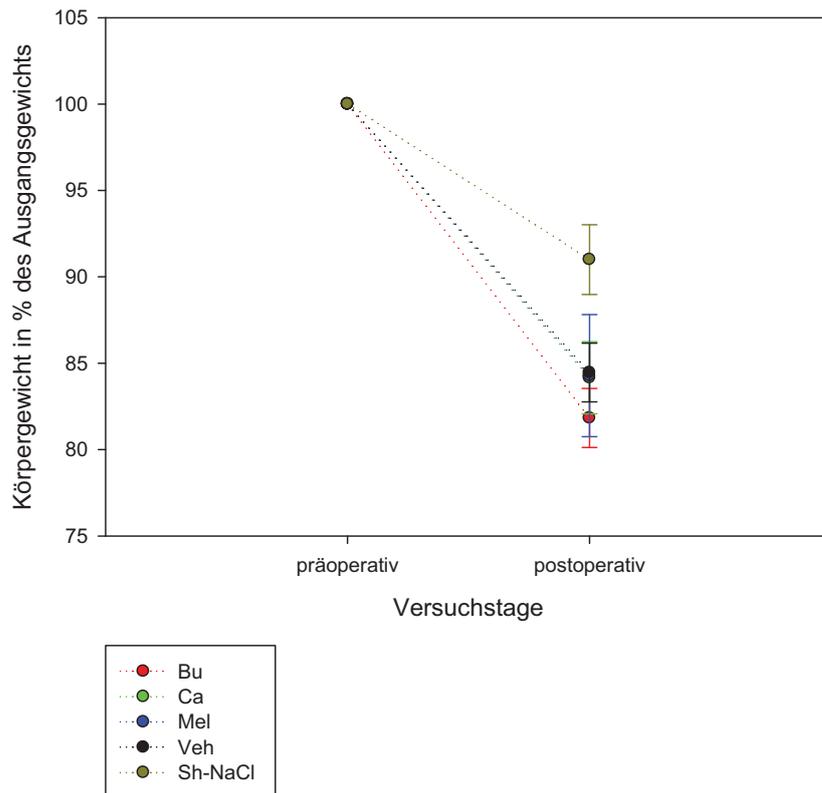


Abbildung 28: SAB-24 h-Studie - Körpergewichte in % des Ausgangsgewichts der Mäuse

Betrachtet man die SAB-Versuchsgruppen, ist bei allen Gruppen eine deutliche Reduktion ihres Körpergewichts postoperativ sichtbar (Abb. 28). Im Mittel verlieren alle SAB-operierten Mäuse ca. 15% ihres Körpergewichts am ersten postoperativen Tag. Zwischen den therapierten und der nicht therapierten SAB-operierten Gruppe kann kein signifikanter Unterschied im postoperativen Gewicht gezeigt werden. Obwohl mit der Sham-OP keine Blutung ausgelöst wird, verlieren auch die SAB-Sham-Tiere an Körpergewicht. Die SAB-operierten Veh-Tiere haben - wie zu erwarten - einen signifikant höheren Gewichtsverlust als die Sham-Tiere ($p = 0,008$).

5.3.2 FUTTERAUFNAHME

Bei Tieren gibt die Futteraufnahme Auskunft über ihr Wohlbefinden. Sinkt die Futteraufnahme bei normalen Klimaverhältnissen, kann das auf Stress, Unwohlsein oder Schmerzen zurückzuführen sein, oder es kann ein pharmakologischer Effekt im Sinne einer Steigerung oder Senkung des Appetites auf Grund von Medikamentengabe vorliegen. Im Folgenden wird die Entwicklung der Futteraufnahme in den einzelnen Studien dargestellt: In allen Studien wird die tägliche Futteraufnahme pro 1 g Körpergewicht angegeben, um vergleichbare Werte zu erhalten. In der CCI-24 h-Studie werden lediglich die CCI-operierten Gruppen verglichen, da die Sham-operierten Gruppen keine bedeutsamen Veränderungen in der Futteraufnahme zeigen.

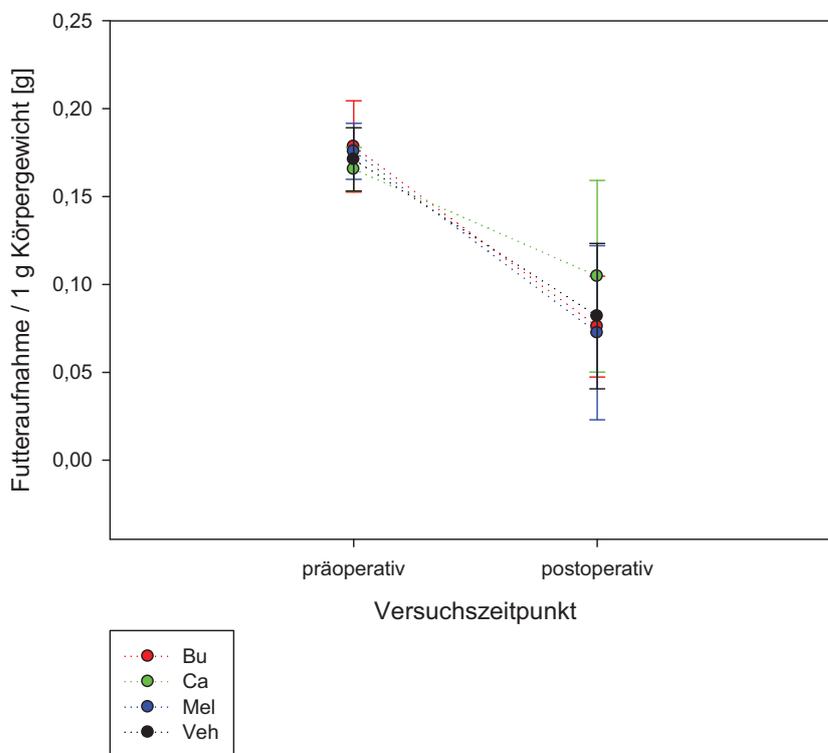


Abbildung 29: CCI-24 h-Studie – Tägliche Futteraufnahme pro 1 g Körpergewicht der CCI-operierten Versuchsgruppen

Wie in Abb. 29 dargestellt, kann zwischen den CCI-operierten Versuchsgruppen der CCI-24 h-Studie weder präoperativ noch postoperativ ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der Futteraufnahme gezeigt werden.

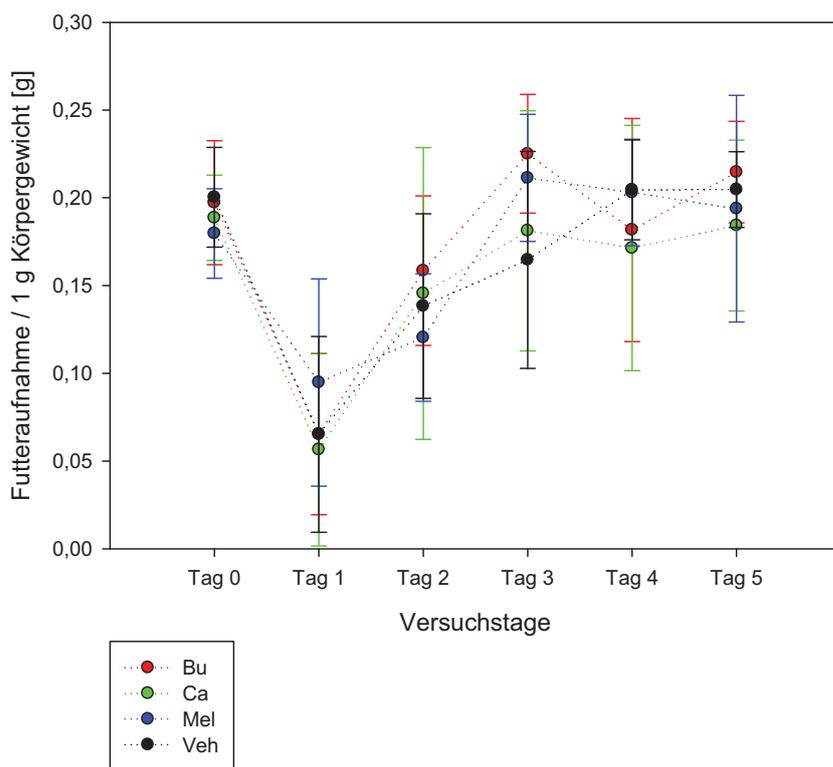


Abbildung 30: CCI-5 d-Studie - Tägliche Futteraufnahme pro 1 g Körpergewicht

Die Abb. 30 zeigt die tägliche Futteraufnahme der Versuchstiere pro 1 g Körpergewicht in der CCI-5 d-Studie. Zwischen den CCI-operierten Versuchsgruppen der CCI-5 d-Studie kann an keinem Tag ein signifikanter Unterschied in der täglichen Futteraufnahme pro 1 g Körpergewicht gezeigt werden. Unabhängig von der Versuchsgruppe zeigen alle Mäuse eine Reduktion der Futteraufnahme am ersten Tag postoperativ. Bis Tag 3 bzw. 4 normalisiert sich die Futteraufnahme der Tiere wieder.

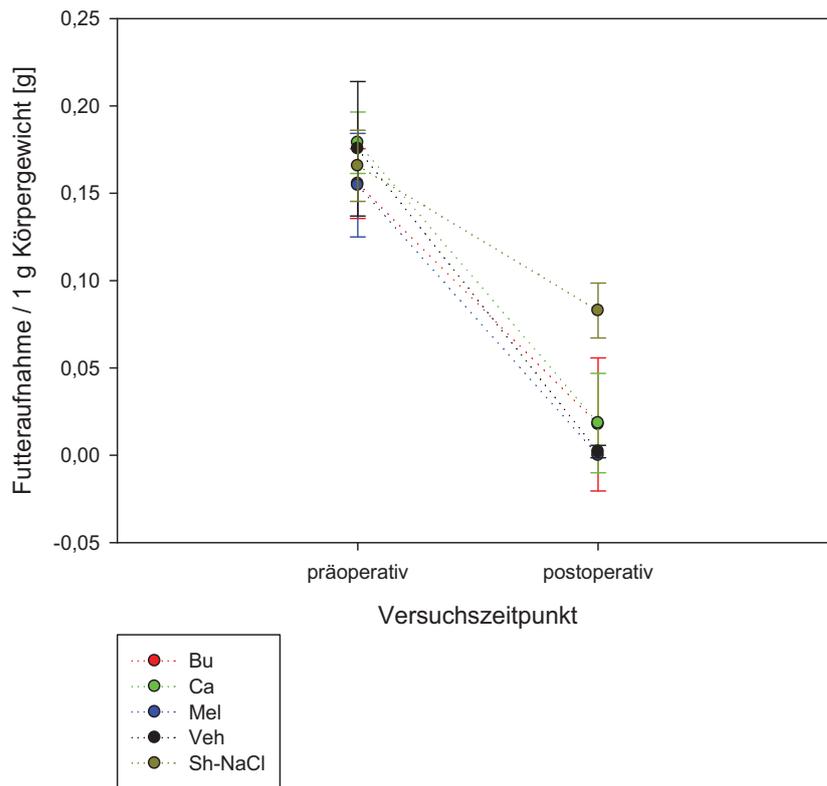


Abbildung 31: SAB-24 h-Studie - Tägliche Futtermittelaufnahme pro 1 g Körpergewicht

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der Futtermittelaufnahmeanalyse der SAB-24 h-Studie dargestellt. Die tägliche Futtermittelaufnahme pro 1 g Körpergewicht fällt unabhängig von der analgetischen Therapie nach SAB postoperativ ab. Alle SAB-Tiere stellen ihre Futtermittelaufnahme annähernd komplett ein, es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den operierten Gruppen gezeigt werden. Auch die Sh-NaCl-Gruppe zeigt postoperativ einen Abfall der Futtermittelaufnahme, jedoch reduzieren die Sham-operierten Mäuse ihre Futtermittelaufnahme im Vergleich zur Veh-Gruppe lediglich und stellen diese nicht vollständig ein ($p=0,008$).

5.3.3 BLUTWERTE

Aus den Parametern der Blutgasanalyse werden lediglich Hämoglobin, Hämatokrit und die Blutglukose der einzelnen Gruppen verglichen, weil aufgrund des gewonnenen Mischblutes Aussagen über pO₂, pCO₂ und pH nicht präzise möglich sind. Die genauen Blutwerte der Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung) sind in den Tabellen 14 - 16 zu sehen. Nur die in der SAB-Studie mit Carprofen behandelte Gruppe zeigt eine signifikante Erhöhung des Blutglukosespiegels durch Carprofen im Vergleich zur Veh- (p = 0,002) und zur Sh-NaCl-Gruppe (p < 0,001). Alle anderen Gruppen zeigen keine signifikanten Gruppenunterschiede in Hämoglobin-, Hämatokrit- und Blutglukosewerten.

Tabelle 14: Prämortale Hämoglobin-Blutwerte aller Studien

	CCI-24 h	CCI-5 d	SAB
Bu-OP	14,8 ± 1,2	14,6 ± 1,1	14,0 ± 0,7
Ca-OP	14,3 ± 2,8	14,4 ± 2,4	13,9 ± 1,6
Mel-OP	13,7 ± 2,7	14,4 ± 0,5	13,3 ± 0,5
NaCl-OP	15,1 ± 1,8	14,9 ± 0,6	14,0 ± 0,6
Sh-Bu	13,4 ± 2,9		
Sh-Ca	14,4 ± 0,9		
Sh-Mel	14,8 ± 0,7		
Sh-NaCl	14,2 ± 0,9		13,8 ± 1,2

Tabelle 15: Prämortale Hämatokrit-Blutwerte aller Studien

	CCI-24 h	CCI-5 d	SAB
Bu-OP	45,3 ± 3,8	44,7 ± 3,2	42,8 ± 2,1
Ca-OP	44,0 ± 8,6	44,2 ± 7,2	41,1 ± 1,7
Mel-OP	42,0 ± 8,2	44,3 ± 1,6	42,8 ± 2,1
NaCl-OP	47,9 ± 4,6	45,7 ± 1,9	43,0 ± 1,8
Sh-Bu	41,0 ± 8,4		
Sh-Ca	44,1 ± 2,8		
Sh-Mel	45,5 ± 2,1		
Sh-NaCl	43,5 ± 2,8		42,5 ± 3,9

Tabelle 16: Prämortale Blutglukosewerte aller Studien

	CCI-24 h	CCI-5 d	SAB
	189 ± 49	191 ± 24	275 ± 13
Ca-OP	193 ± 49	202 ± 21	335 ± 17
Mel-OP	168 ± 41	199 ± 20	284 ± 37
NaCl-OP	182 ± 47	215 ± 21	248 ± 43 * ₁
Sh-Bu	203 ± 69		
Sh-Ca	211 ± 22		
Sh-Mel	204 ± 23		
Sh-NaCl	195 ± 49		224 ± 46 * ₂

*₁ p < 0,001 (vs. Ca-OP)

*₂ p = 0,003 (vs. Ca-OP)

5.3.4 INTRAKRANIELLER DRUCK UND LOKALER ZEREBRALER BLUTFLUSS WÄHREND INDUKTION DER SAB

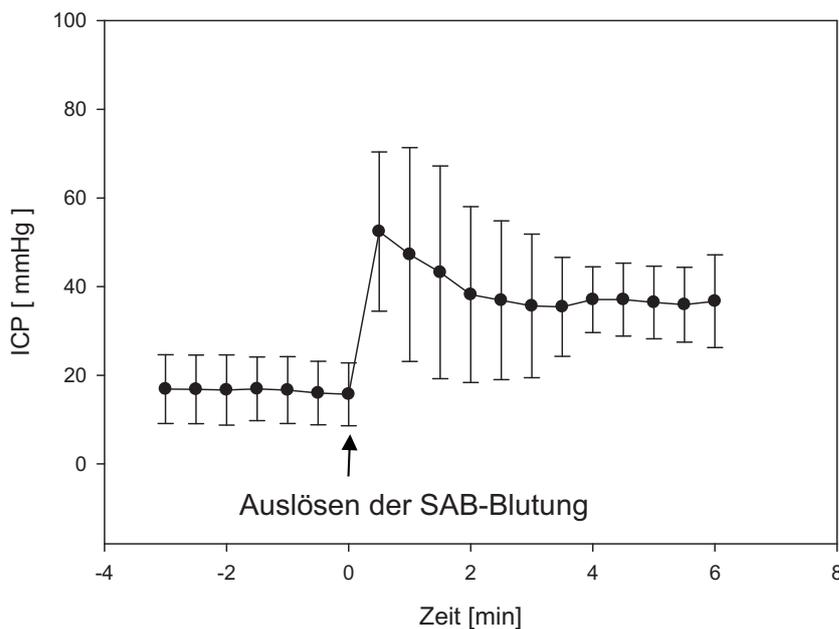


Abbildung 32: Entwicklung des ICP während der SAB-OP in allen SAB-Versuchsgruppen

Bei Induktion der SAB wird der ICP kontinuierlich mit der ICP-Sonde erfasst: Alle Tieren zeigen eine vergleichbar starke Erhöhung des intrazerebralen Drucks nach Auslösen der SAB (Abb. 32). Die Messung des zerebralen Blutflusses dient primär der Positionierung des Fadens, um eine vergleichbare Lokalisation des Blutungsereignisses zu gewährleisten.

5.4 MOLEKULARBIOCHEMISCHE ERGEBNISSE

Die molekularbiochemisch ermittelten Ergebnisse beinhalten die Parameter IL-6, COX-2 und iNOS. Unterteilt nach Studien werden in folgenden Abschnitten zuerst die Expression der Inflammationsparameter nach CCI-24 h und anschließend nach SAB-24 h dargestellt. Zur Korrektur von Schwankungen in der RNA-Quantifikation und cDNA-Synthese wird die Expression der Gene mit der Expression eines Housekeeping Gens – Cyclophilin-A – normalisiert.

5.4.1 MOLEKULARBIOCHEMISCHE ERGEBNISSE DER CCI-24 H-STUDIE

Die molekularbiochemischen Ergebnisse der einzelnen Inflammationsparameter werden jeweils in zwei getrennten Schaubildern dargestellt: Die erste Abb. zeigt die Expression des Inflammationsmarkers in allen CCI-operierten Gruppen, die zweite Abb. die Expression in den unterschiedlich therapierten Sham-Gruppen. Die Inflammationsparameter sind in Prozent der Sh-NaCl-Gruppe angegeben, sie ist in beiden Abb. als Vergleichsgruppe dargestellt.

5.4.1.1 Expression des Inflammationsmarkers IL-6 nach CCI-24 h

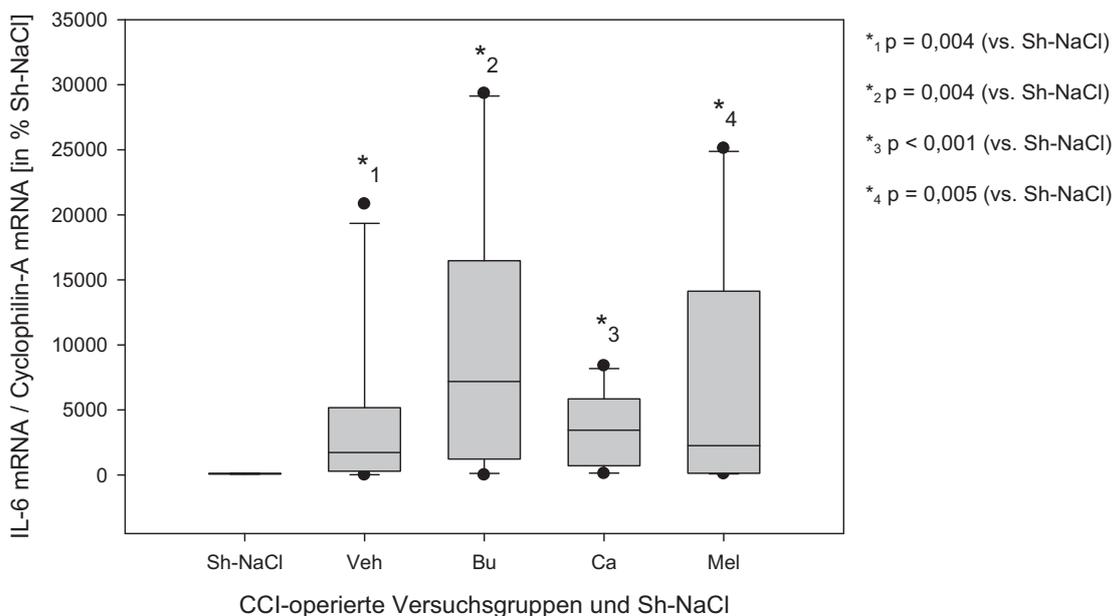


Abbildung 33: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6 (in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen

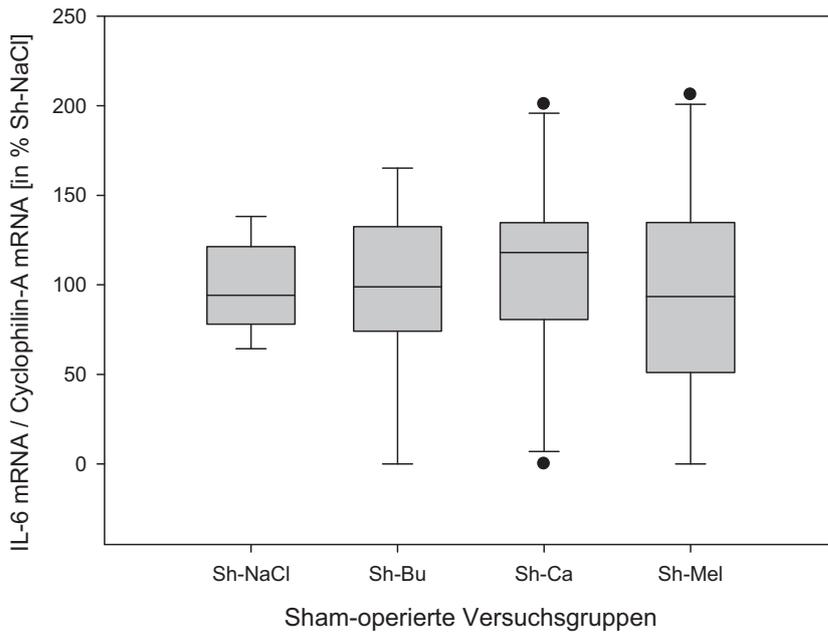


Abbildung 34: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6 (in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen

Die in Abb. 33 und Abb. 34 dargestellte Expression des Inflammationsparameters IL-6 nach CCI-24 h kann folgendermaßen beschrieben werden: Im Vergleich der Sh-NaCl-Gruppe mit den CCI-operierten Versuchsgruppen Veh, Bu, Ca und Mel ist in allen CCI-operierten eine signifikante Erhöhung von IL-6 sichtbar. Im Vergleich der CCI-operierten Versuchsgruppen liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Beim Vergleich der unterschiedlich therapierten Sham-Gruppen (Abb. 34) kann kein Unterschied in der IL-6-Expression festgestellt werden.

5.4.1.2 Expression des Inflammationsmarkers COX-2 nach CCI-24 h

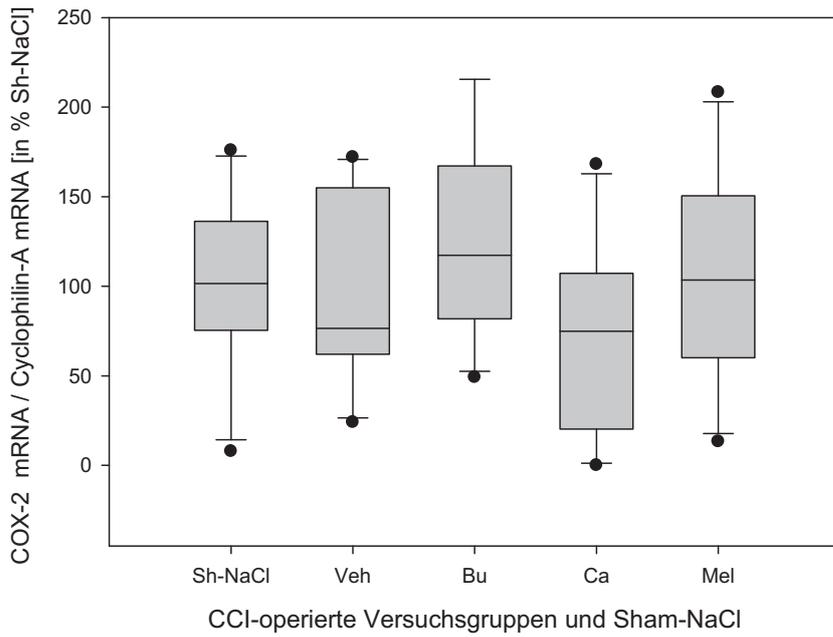


Abbildung 35: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2 (in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen

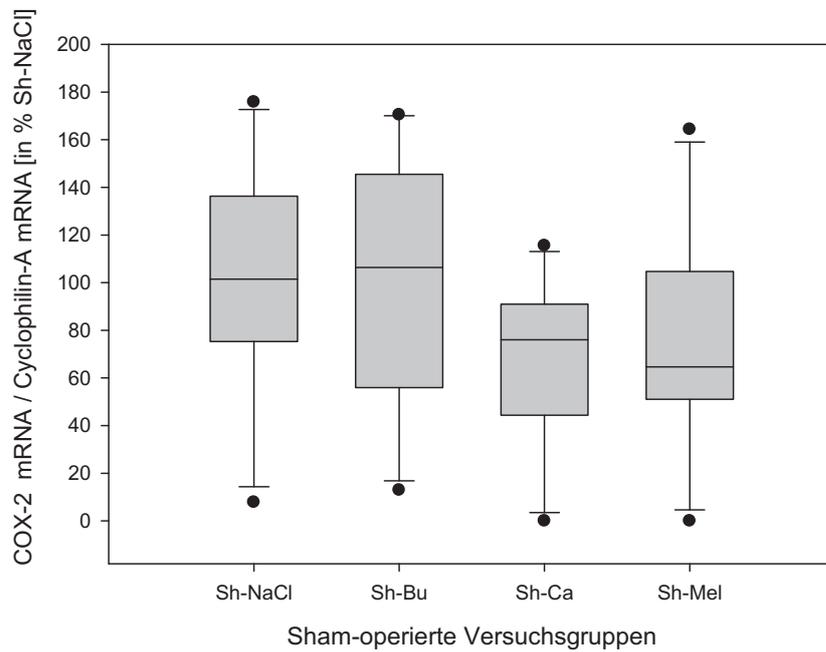


Abbildung 36: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2 (in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen

In Abb. 35 und Abb. 36 ist die Expression des Inflammationsmarkers COX-2 nach CCI-24 bzw. Sham-CCI 24h h graphisch veranschaulicht. Zwischen den in Abb. 35 dargestellten Versuchsgruppen kann kein signifikanter Unterschied in der Expression von COX-2 festgestellt werden. Zwischen den Sham-operierten Gruppen mit verschiedener analgetischer Behandlung (siehe Abb. 36) kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Ebenfalls liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den mit demselben Medikament behandelten CCI- und Sham-Gruppen vor.

5.4.1.3 Expression des Inflammationsmarkers iNOS nach CCI-24 h

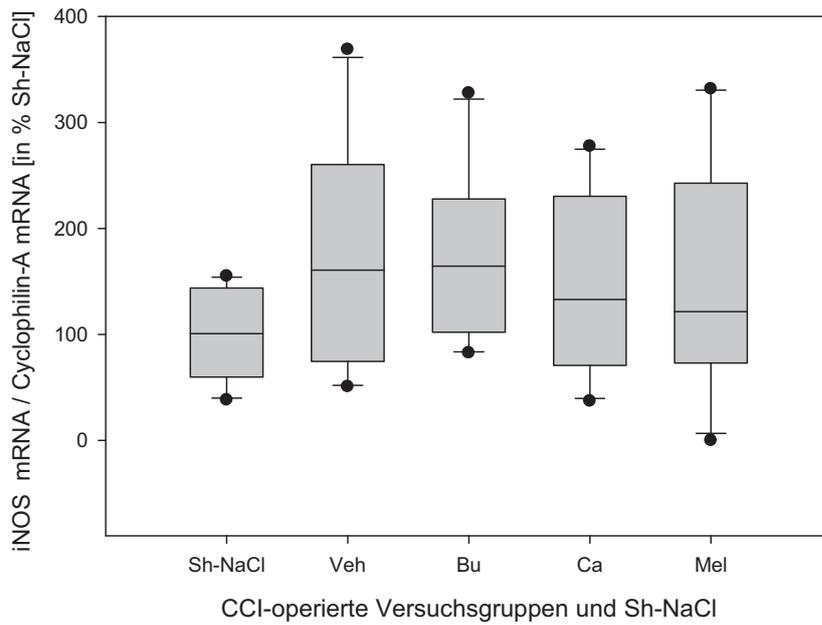


Abbildung 37: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS (in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen

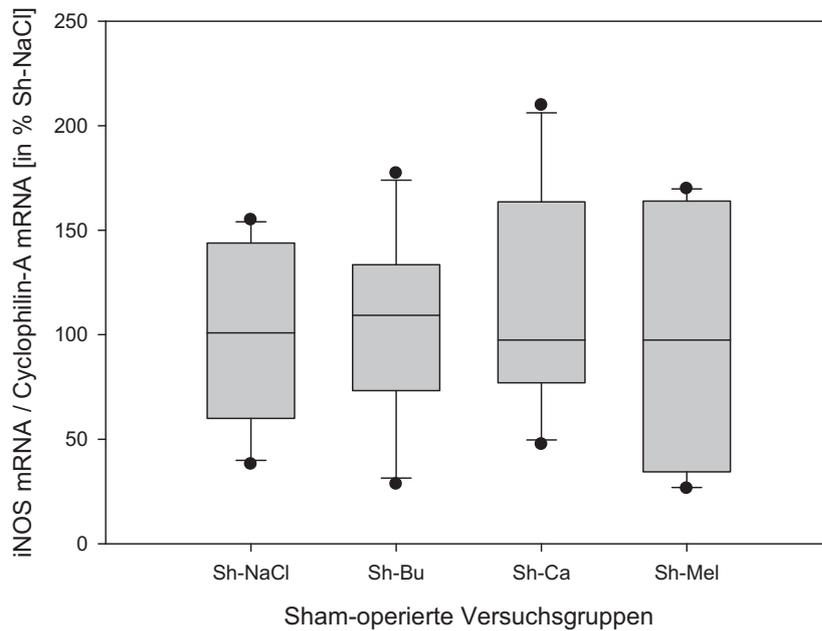


Abbildung 38: CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS (in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen

Die Expression des Inflammationsmarkers iNOS ist in Abb. 37 und Abb. 38 dargestellt. Die für die CCI-24 h-Studie CCI-operierten Versuchsgruppen mit bzw. ohne analgetische Therapie und die Vergleichsgruppe Sh-NaCl sind in Abb. 37 dargestellt. Im Vergleich der Sh-NaCl-Gruppe mit den CCI-operierten Versuchsgruppen kann bei allen CCI-operierten Gruppen eine tendenzielle Erhöhung der Expression von iNOS gezeigt werden, diese ist jedoch bei keiner Gruppe signifikant. Im Vergleich der unterschiedlich therapierten Sham-Gruppen kann kein Unterschied in der Expression von iNOS festgestellt werden.

Vergleicht man die mit demselben Medikament therapierten CCI-Gruppen mit den zugehörigen Sham-Gruppen, kann bei allen Vergleichspaaren eine tendenzielle Erhöhung der iNOS-Expression bei CCI-operierten im Vergleich zu Sham-operierten Tieren gezeigt werden. Diese Erhöhung ist lediglich bei der mit Buprenorphin behandelten Gruppe signifikant ($p = 0,028$).

5.4.2 MOLEKULARBIOCHEMISCHE ERGEBNISSE DER SAB-24 h-STUDIE

Die in der SAB-Studie gemessenen Inflammationsparameter werden jeweils in Prozent der Sh-NaCl-Gruppe in den Abb. 39 - 41 dargestellt.

5.4.2.1 Expression des Inflammationsmarkers IL-6 nach SAB-24 h

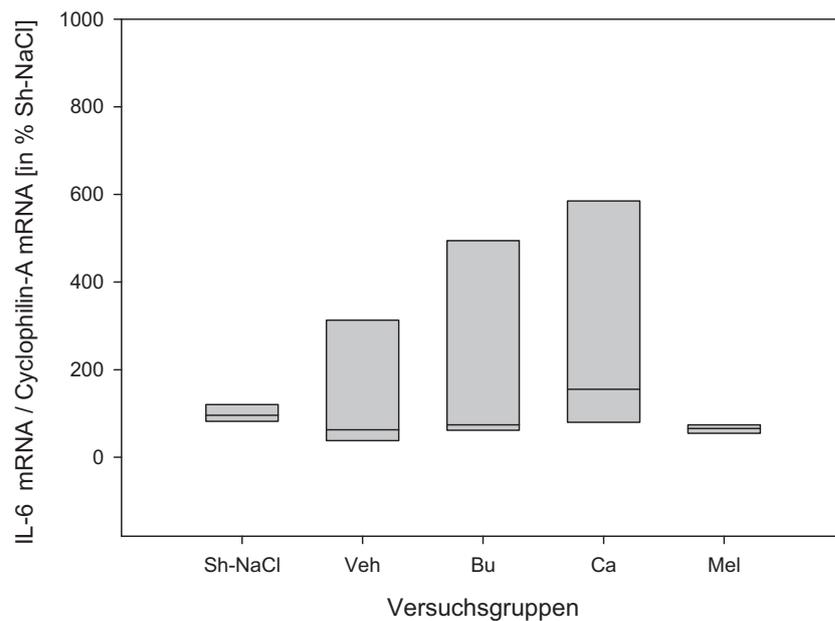


Abbildung 39: SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6 (in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen

In Abb. 39 wird die Expression des Inflammationsmarkers IL-6 in den verschiedenen Versuchsgruppen der SAB-Studie dargestellt: Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. Die SAB-operierten Gruppen, unabhängig von der analgetischen Behandlung, weisen keine Änderung in der Expression von IL-6 auf.

5.4.2.2 Expression des Inflammationsmarkers COX-2 nach SAB-24 h

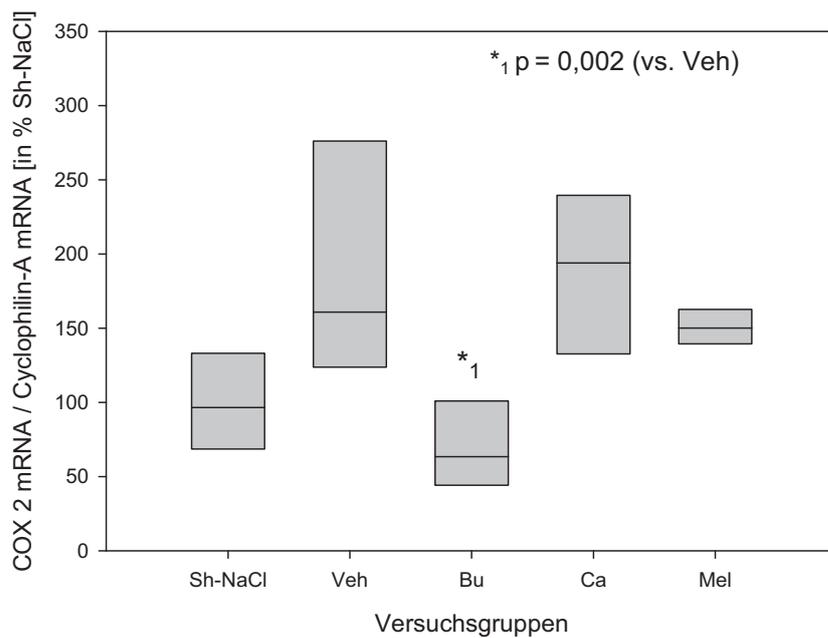


Abbildung 40: SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2 (in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen

Beim Vergleich der SAB-operierten Versuchsgruppen (Abb.40) kann gezeigt werden, dass die Bu-Gruppe eine signifikant niedrigere COX-2-Expression als die Veh-Gruppe aufweist. Die mit Carprofen und Meloxicam behandelten Versuchsgruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der COX-2-Expression im Vergleich zur Veh-Gruppe.

5.4.2.3 Expression des Inflammationsmarkers iNOS nach SAB-24 h

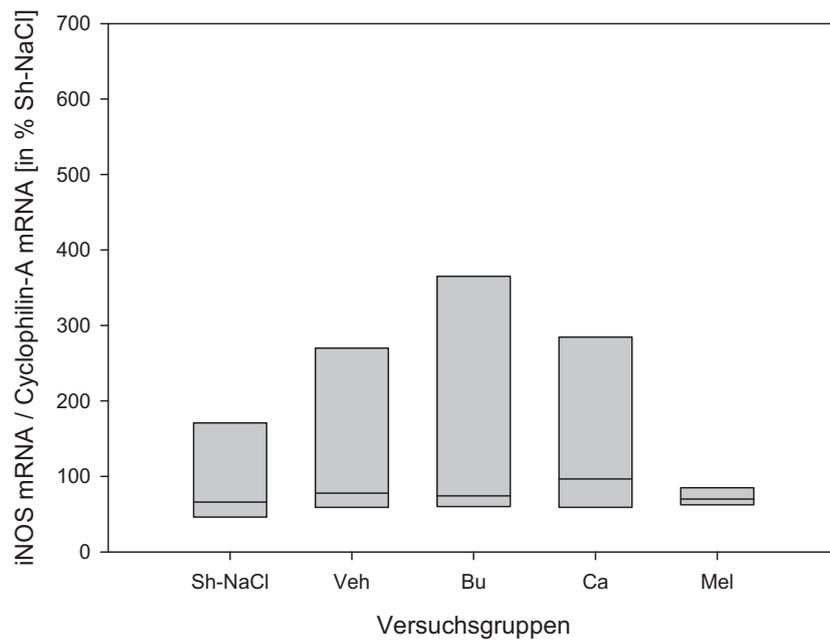


Abbildung 41: SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS (in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen

Zwischen den in Abb. 41 dargestellten SAB Versuchsgruppen kann kein signifikanter Unterschied in der Expression von iNOS festgestellt werden.

5.5 SCORE-SYSTEME

In vorliegender Studie werden zwei Score-Systeme angewendet, der NS und der KS. Im Folgenden werden die Ergebnisse beider Score-Systeme gegliedert nach den unterschiedlichen Studien wiedergegeben. Sowohl im Ergebnisteil des NS als auch des KS werden zuerst die Ergebnisse der CCI-24 h-Studie, anschließend die Gesamtergebnisse der CCI-5 d-Studie und als letztes die Ergebnisse der SAB Studie gezeigt.

5.5.1 NEUROSCORE

Der NS gibt Auskunft über den neurologischen Status der Tiere. Die Mäuse erhalten für neurologische Defizite, z.B. Lähmung der Gliedmaßen oder Hörverlust, je nach Ausprägung eine vorgegebene Punktzahl. Die Gesamtpunktzahl ist in folgenden Abb. dargestellt.

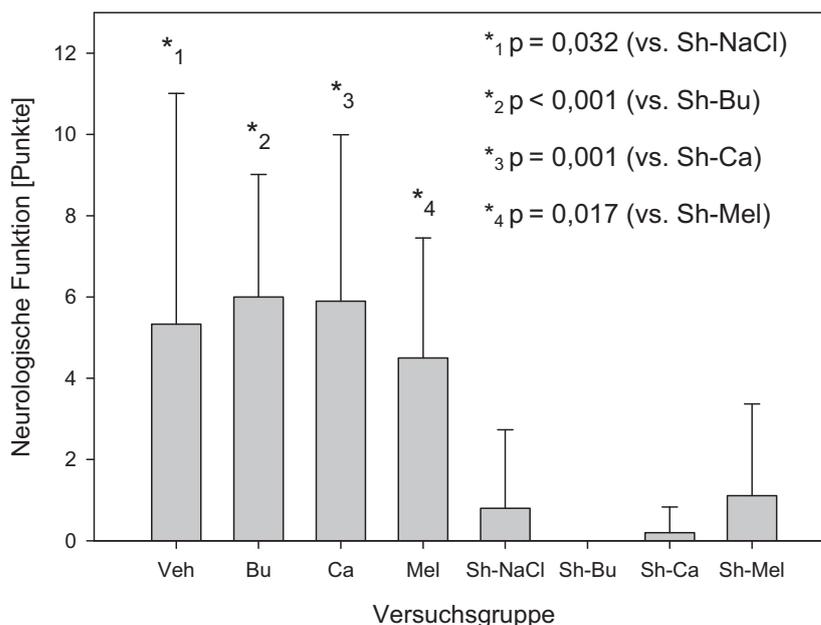


Abbildung 42: CCI-24 h-Studie - Postoperativer NS der Versuchsgruppen

Im postoperativen NS der CCI-24 h-Studie kann zwischen analgetisch therapierten und nicht therapierten CCI-Gruppen kein Unterschied im NS festgestellt werden (Abb. 42). Des Weiteren kann kein signifikanter Unterschied im postoperativen NS zwischen den verschiedenen Sham-Gruppen gezeigt werden. Im Vergleich der Sham- und CCI-operierten Gruppen, die mit demselben Medikament behandelt wurden, zeigen die operierten Gruppen eine schlechtere neurologische Funktion als die der Sham-Gruppen.

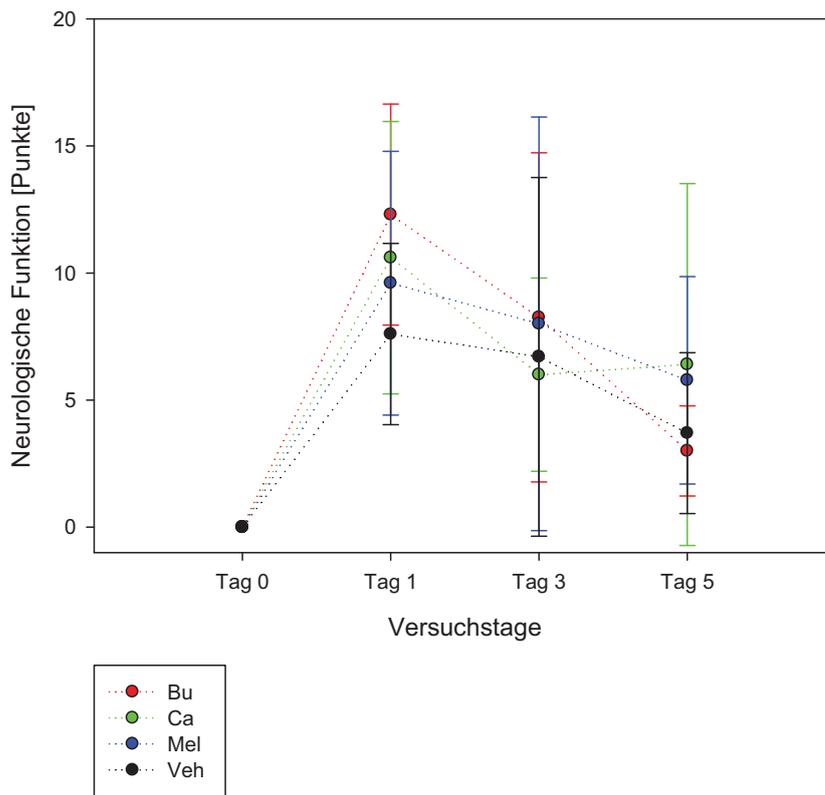


Abbildung 43: CCI-5 d-Studie – Täglicher postoperativer NS der Versuchsgruppen

An keinem Tag der CCI-5 d-Studie liegt zwischen den Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied in der neurologischen Funktion vor (Abb. 43).

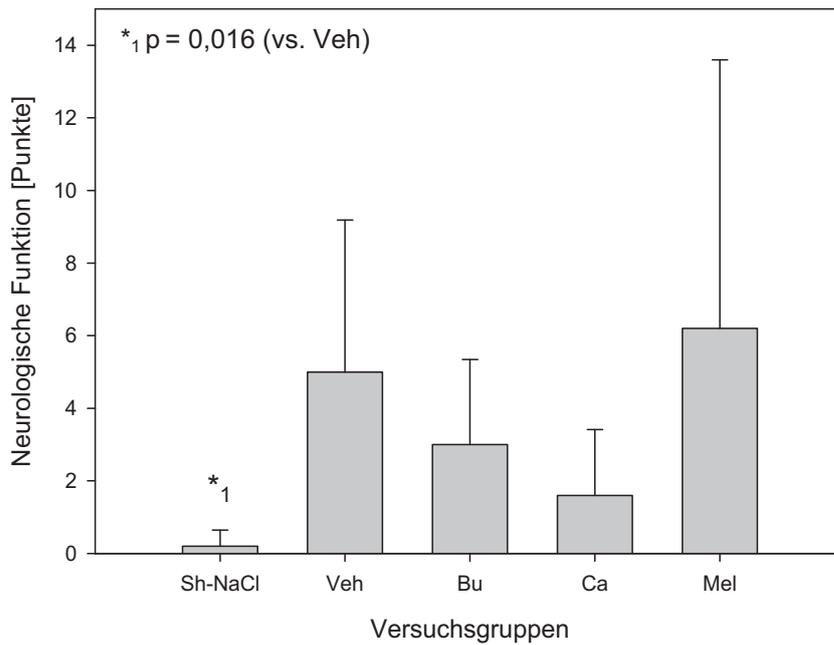


Abbildung 44: SAB-24 h-Studie - Postoperativer NS der Versuchsgruppen

Im Vergleich der SAB-operierten Versuchsgruppe ohne Therapie (Veh), führt die Analgetikatherapie zu keiner signifikanten Änderung des postoperativen NS der Tiere (Abb. 44). Die Sh-NaCl-Gruppe weist einen signifikant niedrigeren NS-Level auf als die SAB-operierte Veh Gruppe. Dies war zu erwarten, da bei der Sh-NaCl-Gruppe keine Gehirnschädigung induziert wird.

5.5.2 KOMFORTSCORE

Die Punktzahl des KS gibt Auskunft über Schmerzniveau und Wohlbefinden der Tiere; eine hohe Punktzahl im KS spiegelt einen schlechten Allgemeinzustand der Maus wider.

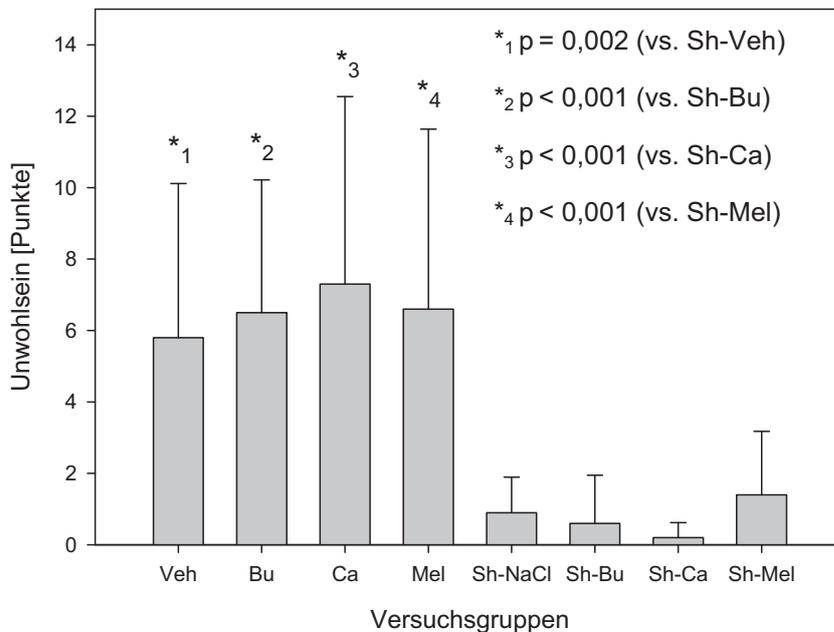


Abbildung 45: CCI-24 h-Studie - Postoperativer KS der Versuchsgruppen

In der Punktzahl des KS der CCI-24 h-Studie (Abb. 45), kann zwischen den CCI-operierten Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Zwischen den unterschiedlich analgetisch therapierten Sham-Gruppen ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied sichtbar.

Ein signifikanter Unterschied ist beim Vergleich zwischen den CCI- und Sham-Gruppen (Veh, Bu, Ca), die mit demselben Medikament werden, zu erkennen.

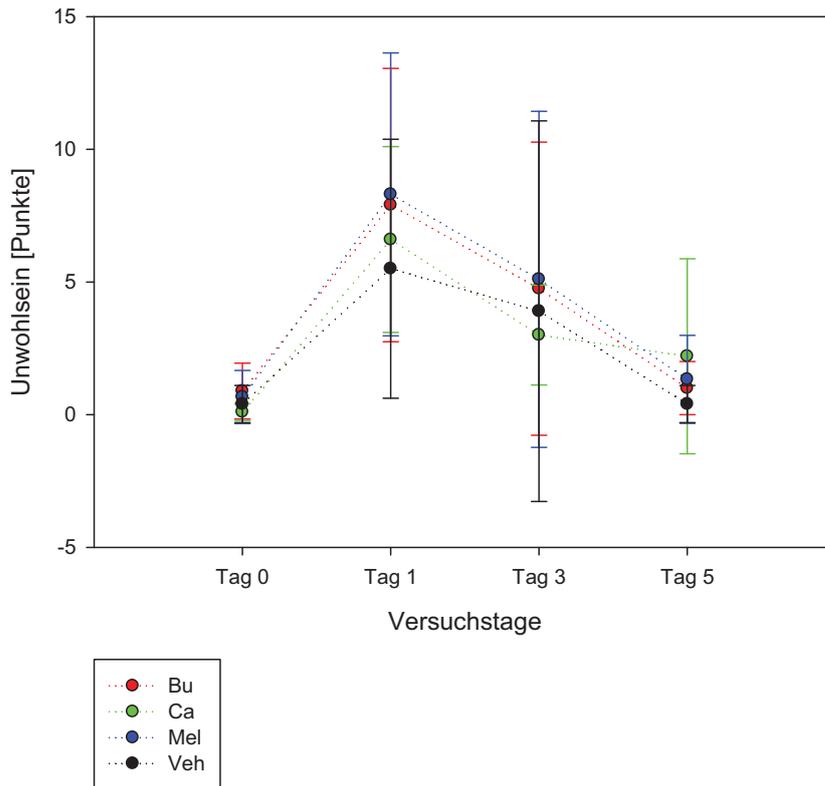


Abbildung 46: CCI-5 d-Studie - Täglicher postoperativer KS der Versuchsgruppen

Vergleicht man den KS der fünftägigen CCI-Studie (Abb.46), ist zwischen der therapierten und den nicht therapierten Versuchsgruppen an keinem Tag ein signifikanter Unterschied sichtbar.

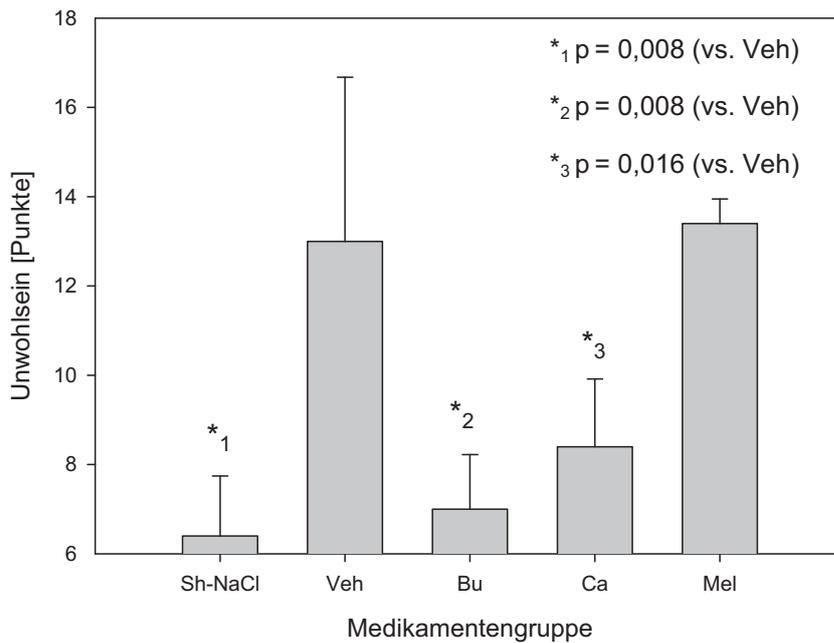


Abbildung 47: SAB-24 h-Studie - Postoperativer KS der Versuchsgruppen

In der SAB-Studie (siehe Abb. 47) hat die Bu-Gruppe im Vergleich zur Veh-Gruppe einen signifikant niedrigeren KS. Das zeigt, dass die mit Burprenorphan behandelten Tiere ein besseres Allgemeinbefinden und einen niedrigeren Schmerzlevel nach SAB haben als die nicht analgetisch behandelten Veh-Tiere. Der KS-Level der Bu-Gruppe ist annähernd so gut wie der KS-Level der lediglich Sham-operierten Gruppe.

Im Vergleich der mit Carprofen therapierten Gruppe zu der nicht therapierten Veh-Gruppe ist ebenfalls ein signifikanter Unterschied feststellbar. Desweiterer ist wie zu erwarten, der KS der Sham-operierten Tiere im Vergleich zu Veh-Gruppe signifikant geringer.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Therapie mit Buprenorphan sowie Carprofen den KS der Mäuse verringert im Vergleich zu der nicht therapierten Veh-Gruppe.

6 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie ist, den Einfluss von perioperativer Analgesie nach SHT und SAB bei dem Versuchstier Maus auf sekundäre pathophysiologische Prozesse sowie Schmerzbelastung zu prüfen. Die aus der Studie gewonnenen Ergebnisse werden im ersten Abschnitt der Diskussion besprochen. Der zweite Abschnitt der Diskussion geht auf weitere ausgewählte Fragestellungen zum Themenbereich Schmerzen und Analgesie beim Versuchstier ein.

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnis-Diskussion analysiert zunächst die Ergebnisse des HW-Gehalts in beiden Hemisphären nach CCI. Um durch Analgetika verursachte Veränderungen in den pathophysiologischen Prozessen zu ermitteln, werden Resultate der histologischen Färbungen in Form von Kontusionsvolumina und Mikrogliaaktivierung erörtert. Des Weiteren erfolgt eine Erläuterung der Befunde der physiologischen Parameter Körpergewichtsentwicklung, Futteraufnahme und Blutparameter. Die sowohl im SHT- als auch im SAB-Tiermodell auf RNA-Ebene ermittelten Inflammationsmarker IL-6, COX-2 und iNOS werden in folgendem Abschnitt diskutiert. Als abschließender Abschnitt der Ergebnis-Diskussion werden die neurologische Funktion sowie die Schmerzbelastung der Tiere, anhand der Ergebnisse des NS und KS, erörtert.

6.1.1 HIRNWASSERGEHALT NACH CCI-24 H

In der vorliegenden Studie wird die Ausprägung des Hirnödems quantifiziert, indem der HW-Gehalt mit der Wet-Dry-Methode gemessen wird.

Laut einer Untersuchung von **Soares et al.** (131) entsteht ein signifikantes Hirnödem auf der geschädigten Seite im Vergleich zur nicht beeinträchtigten Hemisphäre ab sechs Stunden nach Insult. Das nach SHT bestehende Hirnödem weitet sich aus und erreicht laut Untersuchungen von **Zweckberger et al.** (165) und **Baskaya et al.** (10) seine maximale Ausdehnung nach 24 Stunden. Das Hirnödem kann laut **Soares et al.** (131) und **Bareyre et al.** (9) bis zum fünften Tag nach Insult nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wird geprüft, ob sich die Ausprägung des Hirnödems nach CCI durch analgetische Behandlung der Tiere verändert. Der Untersuchungszeitpunkt wird auf 24 Stunden posttraumatisch gelegt, um die maximale Ausdehnung des Hirnödems zu messen. Zu diesem Zeitpunkt kann bei allen Tieren nach SHT auf der Läsionsseite ein Anstieg des HW-Gehaltes im Vergleich zur nicht beeinträchtigten Hemisphäre gezeigt werden. Sowohl bei den CCI-operierten Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren ist keine Änderung des HW-Gehaltes aufgrund der Analgetikatherapie messbar.

Ein durch Carprofen verringerter HW-Gehalt 24 Stunden nach SHT in der Schadenshemisphäre im Vergleich zur Veh-Gruppe, welcher in Untersuchungen von **Thau-Zuchmann et al.** (142) beschrieben wird, kann in vorliegender Studie nicht gezeigt werden. **Hakan et al.** (48) zeigen in SHT-Versuchen an der Ratte, welche durch das Weight-Drop-Tiermodell ausgelöst werden, eine Erhöhung des HW-Gehalts 48 h nach SHT. Der in **Hakan et al.** (48) Untersuchung erhöhte HW-Gehalt wird durch die Therapie mit Meloxicam im Vergleich zur Veh-Gruppe leicht reduziert. Im Vergleich zu der für diese Arbeit durchgeführten Studie, in der das CCI-Tiermodell verwendet wird, wird in den Untersuchungen von **Thau-Zuchmanns et al.** (142) und **Hakan et al.** (48) das Weight-Drop-Tiermodell verwendet, welches ein diffuses SHT hervor ruft im Unterschied zum CCI Modell, das ein fokales SHT auslöst. Ein Vergleich von unterschiedlichen Formen des SHT kann nur bedingt getätigt werden.

6.1.2 HISTOLOGIE

6.1.2.1 Kontusionsvolumen – Nissl-Färbung nach CCI-5 d

Die Färbung nach Nissl ist eine Standardfärbung in der Histologie, die traditionell zur Evaluierung des Läsionsvolumens eingesetzt wird (66). Das Verfahren zur Herstellung der Hirnschnitte und die Auswertung des histologischen Schadens werden standardisiert durchgeführt. Im geschädigten Gewebe bestehen deutliche Anzeichen von physikalischer Beschädigung. Es sind sowohl lytische Zellen als auch zu Grunde gegangene Zellen sichtbar, beide färben sich nicht mit Kresylviolett an. Die kontralaterale Hemisphäre erscheint in der Nissl-Färbung durchgängig dunkelviolet gefärbt. Da alle Mäuse einer 15-minütigen Narkose mit Isofluran unterzogen werden, beeinflusst der in der Literatur beschriebene neuroprotektive Effekt von Isofluran (32) die Auswertung nicht.

In dieser Studie soll der Einfluss von analgetischer Therapie auf die Ausprägung des Läsionsbereiches nach CCI gezeigt werden. Insgesamt reduzierte sich die Tierzahl in der CCI-5

d-Studie um fünf Mäuse, weil diese vor Studienende verstarben. Der Ausschluss der Tiere erfolgt vor der Daten-Entblindung des Untersuchers.

Die Ergebnisse des Schadenvolumens nach CCI-5 d ergeben keine signifikanten Unterschiede zwischen analgetisch behandelten Tieren und Vehikel. Dies steht im Kontrast zu einer Studie von **Thau-Zuchmann et al.** (142), welche einen neuroprotektiven Effekt von Carprofen 90 Tage nach SHT zeigt. Für die gegensätzlichen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Tiermodelle, die verwendet werden, um das SHT auszulösen, ein Grund sein. Der Schaden, der durch das Weight-Drop bzw. CCI-Modell hervorgerufen wird, ist in Ausprägung und Verteilung unterschiedlich und dadurch nur bedingt vergleichbar. Die Analgetika Carprofen und Meloxicam hemmen die COX-2 und teilweise COX-1. Um diesen Aspekt zu würdigen, wird im Folgenden die Schadensentwicklung nach SHT bei COX-2- bzw. COX-1-defizienten Knockout-Mäusen beschrieben. COX-2 defiziente Mäuse, haben laut **Kelso et al.** (73) einen signifikant größeren Schaden nach mildem CCI im Vergleich zu Wildtypen. Bei COX-1 defizienten Mäusen kann dagegen kein Unterschied zu Wildtypen in der Schadensgröße nach CCI gezeigt werden.

6.1.2.2 Mikroglia – Iba-1-Färbung nach CCI-5 d

An der Immunantwort nach Schädigung des Gehirns sind Mikrogliazellen beteiligt, denn nach Eintritt des Schadens erfolgen unter anderem (u.a.) eine Aktivierung der Mikrogliazellen und deren vermehrte Einwanderung in den beschädigten Bereich und dessen Randzone. Schon sechs Stunden nach Insult kommt es zu einer nachweisbaren Aktivierung der Mikroglia (72), die an einer Erhöhung der mit Iba-1-gefärbten Mikrogliazahlen sichtbar ist. Die Mikrogliaaktivierung steigt bis zum dritten Tag post Trauma an und sinkt danach bis Tag 14 wieder stark ab. Am 14. posttraumatischen Tag ist keine Mikrogliaaktivierung mehr nachweisbar (118).

Aufgrund der schwierigen Unterscheidbarkeit zwischen der Läsion und dem nicht geschädigten Gewebe in der Iba-1-Färbung gestaltet sich die Positionierung des Untersuchungsfensters in manchen Schnitten als schwierig. Um eine Ungenauigkeit in der Übereinstimmung der gewählten Fenster auszugleichen, werden wie im Methodenteil erläutert drei aufeinanderfolgende Schnitte in gleicher Art und Weise ausgewertet. Die Untersuchung der Aktivierung der Mikroglia in der vorliegenden Studie erfolgt am fünften Tag post Trauma. Es kann zwischen den analgetisch behandelten Gruppen im Vergleich zur Veh-Gruppe kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Verschiedene Ursachen kommen in Frage: Wie oben erläutert, nimmt schon ab dem dritten Tag post Trauma die Anzahl der aktivierten Mikroglia wieder stark ab, daher wird die Untersuchung (in dieser Studie) nicht am Tag der Maximalausprä-

gung dieses Parameters durchgeführt. Es könnte also am dritten Tag ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen vorgelegen haben, der am fünften Tag jedoch nicht mehr nachweisbar ist. In einer Untersuchung von **Thau-Zuchmann et al.** (142) reduziert Carprofen die Anzahl der Mikroglia nach SHT. Ein Unterschied zwischen der Studie von **Thau-Zuchmann et al.** (142) und vorliegender Studie ist der Untersuchungszeitpunkt der Mikroglia. Die Untersuchung von **Thau-Zuchmann et al.** (142) wird am 90. posttraumatischen Tag durchgeführt, wohingegen in der vorliegenden Studie die Mikroglia schon am fünften postoperativen Tag untersucht wird. Bei dem Parameter Mikroglia bleibt ebenfalls zu bedenken, dass in der vorliegenden Studie und in der Untersuchung von **Thau-Zuchmann et al.** (142) verschiedene Tiermodelle verwendet werden und der Untersuchungszeitpunkt stark variiert.

6.1.3 PHYSIOLOGISCHE PARAMETER

Die Effizienz der analgetischen Behandlung wird in dieser Studie zusätzlich neben dem KS anhand von Futteraufnahme und Körpergewichtsentwicklung beurteilt. Studien von **Liles** und **Flecknell** (83) zeigen, dass Futteraufnahme und Körpergewicht zur Schmerzdetection geeignet sind. Tiere mit Schmerzen reduzieren ihre Futteraufnahme und erleiden einen Gewichtsverlust. Als weiterer physiologischer Parameter werden die Blutwerte: Hämoglobin, Hämatokrit und Blutglukose der Gruppen verglichen.

6.1.3.1 Körpergewicht

In der vorliegenden Studie zeigen alle Versuchsgruppen sowohl nach CCI- als auch nach SAB-OP einen deutlichen Gewichtsverlust am ersten postoperativen Tag. Da die CCI Sham-operierten Tiere keinen Gewichtsverlust aufweisen, bestätigt der Gewichtsverlust der operierten Tiere, dass sowohl das CCI- als auch das SAB-Tiermodell schmerzhaft Eingriffe sind. Die CCI-operierten Tiere haben am ersten postoperativen Tag einen Gewichtsverlust von ca. 10%. Die SAB-operierten Tiere weisen einen im Vergleich mit CCI höheren Gewichtsverlust von ca. 15% auf. Die Ergebnisse bestätigen, dass der Schmerzgrad bei der Maus nach SAB – wie beim Menschen wesentlich höher ist als nach SHT.

In beiden CCI-Studien können zwischen den analgetisch behandelten und nicht therapierten Tieren keine signifikanten Unterschiede in der täglichen Körpergewichtsentwicklung gezeigt werden. Hierfür können verschiedene Gründe vorliegen. Der erste Grund könnte sein, dass die drei verwendeten Analgetika zu keiner Schmerzlinderung nach CCI führen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Mäuse nach moderater CCI lediglich ein niedriges Schmerzni-

veau aufweisen und dieses durch die Analgesie lediglich geringgradig reduziert werden kann; eine nur geringe Reduktion des Schmerzniveaus würde sich nicht im Körpergewicht widerspiegeln.

Im Vergleich der SAB-operierten Mäuse kann ebenfalls zwischen therapierten und nicht therapierten Versuchsgruppen keine signifikante postoperative Gewichtsänderung gezeigt werden. Wie oben beschrieben ist das Schmerzniveau nach SAB außerordentlich hoch. Es kann durch Analgesie mit Buprenorphin und Carprofen zwar gesenkt werden (siehe Ergebnissteil KS nach SAB), jedoch nicht so weit, dass eine unterschiedliche Appetitsteigerung zwischen den Versuchsgruppen entsteht, die an einem signifikanten Unterschied im Körpergewicht sichtbar wäre.

Abschließend kann gesagt werden, dass der Parameter Gewicht zwar geeignet ist, um einen Unwohlsein der Mäuse anzuzeigen, welcher mit Schmerzen verbunden sein könnte, nach vorliegender Studie zeigt sich allerdings, dass Feinabstufungen im Wohlbefinden nicht anhand des Gewichts ermittelt werden können.

6.1.3.2 Futteraufnahme

Die Futteraufnahme kann Aufschluss über die Schmerzpräsenz bei Tieren geben. In Untersuchungen von **Aras et al.** (6) wird gezeigt, dass bei Mäusen nach Laparotomie eine reduzierte Futteraufnahme, Gewichtsverlust und fehlendes Nestbauverhalten aussagekräftige Parameter zur Schmerzerfassung sind. Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge zeigen die Mäuse beider Tiermodelle – sowohl CCI als auch SAB – unabhängig von der Versuchsgruppe postoperativ eine deutliche Reduktion ihrer Futteraufnahme. Beim Vergleich der beiden Tiermodelle ist sichtbar, dass die CCI-operierten Mäuse ihre Futteraufnahme zwar reduzieren, aber nicht vollständig einstellen, wie das beim SAB-Modell der Fall ist. Da auch beim Menschen der Schmerzgrad nach SAB wesentlich höher ist als nach einem moderaten SHT, spiegelt die Futteraufnahme der Mäuse den im Tierversuch eingetretenen Schmerzlevel gut wider. Eine Einflussnahme auf die Futteraufnahme durch analgetische Therapie kann nicht gezeigt werden.

Dass das Medikament Buprenorphin die Futteraufnahme steigert – einer Untersuchung von **Blaha et al.** (15) zufolge – ist in vorliegender Studie lediglich tendenziell in der CCI-5 d-Studie sichtbar.

Eine signifikant verbesserte Futteraufnahme nach Analgetikatherapie kann in keiner der drei Studien nachgewiesen werden, dies lässt die Vermutung zu, dass die Analyse der Futteraufnahme in derartigen Studien nicht geeignet ist, geringe Schmerzunterschiede zu ermitteln.

6.1.3.3 Blutwerte

In keinem Experiment kann ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen in den Blutparametern gezeigt werden. Ausgenommen davon ist die SAB-Studie, in welcher die mit Carprofen behandelte Gruppe signifikant höhere Blutglukosewerte aufweist als die Veh- sowie Sh-NaCl-Gruppe.

In Stresssituationen werden Stresshormone zum Beispiel Cortisol ins Blut ausgeschüttet. Dieses in der Leber gebildete Hormon wirkt dem Insulinspiegel entgegen und hat einen Anstieg des Glukosespiegels im Blut zur Folge (52). Aufgrund dieser Physiologie könnte davon ausgegangen werden, dass sich Glukose als Stressparameter eignet. Da die mit Carprofen therapierten Tiere im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe in der SAB-Studie einen verbesserten KS aufweisen, kann der Rückschluss gezogen werden, dass die Ca-Tiere weniger Stress und Schmerzen ausgesetzt sind als die Veh-Tiere. Damit wird gezeigt, dass der erhöhte Glukosespiegel nicht den empfundenen Stresslevel widerspiegelt, was bereits **Kehlet** (71) in einer Untersuchung am Menschen beschreibt. Desweiteren ist der Glukosespiegel abhängig von dem Futteraufnahmezeitpunkt und der Futteraufnahmemenge, was einen Vergleich ebenfalls schwierig macht, da nicht bekannt ist wann die Mäuse zuletzt gefressen haben. Da in der Literatur keine Normwerte für eine Blutgasanalyse von Mischblut bei der C57Bl/6N-Maus vorliegen, kann nicht beurteilt werden, ob die ermittelten Blutwerte im physiologischen Bereich liegen.

6.1.4 MOLEKULARBIOCHEMISCHE PARAMETER, IL-6, COX-2 UND INOS

In vorliegender Studie werden die Inflammationsparameter IL-6, COX-2 und iNOS nach CCI und SAB untersucht. In den folgenden drei Abschnitten wird einzeln auf die genannten Parameter eingegangen.

6.1.4.1 IL-6

In vorliegender Studie kann ebenfalls eine Erhöhung der Expression von IL-6 24 h nach CCI kann gezeigt werden, entsprechend wie dies in der Literatur beschrieben ist (49, 50, 126). Es bleibt unklar, ob der optimale Tötungszeitpunkt zur Erfassung der Maximalexpression von IL-6 mit dem Zeitpunkt 24 Stunden postoperativ verwendet ist, da in der Literatur verschiedene Zeitfenster für den Anstieg von IL-6 nach SHT genannt werden. Die Anfangsphase der

IL-6 Expressionserhöhung aufgrund von SHT wird mit 1 – 8 Stunden posttraumatisch angegeben, das Maximum wird studienabhängig mit 18 bzw. 24 Stunden posttraumatisch erreicht (134, 137).

Zwischen den analgetisch und den nicht therapierten CCI- bzw. CCI-Sham-Versuchsgruppen ist in vorliegender Studie kein Unterschied in der Expression von IL-6 sichtbar. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Einflussnahme durch die Analgetika Buprenorphin, Carprofen und Meloxicam auf die Expressionslevel von IL-6, 24 h nach CCI unwahrscheinlich ist. Laut einer Studie von **Thau-Zuchmann et al.** (142) senkt Carprofen bei Mäusen das Level von IL-6 nach SHT signifikant. Die Untersuchung von **Thau-Zuchmann et al.** (142) wurde mit dem Weight-Drop-Modell an Mäusen durchgeführt. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Untersuchung des IL-6 von **Thau-Zuchmann et al.** (142) vier Stunden post-Trauma durchgeführt wurde – im Unterschied zu 24 h post Trauma in vorliegender Studie. In der SAB-Studie kann keine Erhöhung der IL-6 Levels durch SAB gezeigt werden. Die analgetisch therapierten SAB-Versuchsgruppen unterscheiden sich ebenfalls nicht in ihrer Expression von IL-6.

6.1.4.2 COX-2

Der Anstieg von COX-2 im Gehirn ist verbunden mit der zentralen entzündlichen Reaktion und dem verspäteten Tod von Nervenzellen. Dieses Geschehen verursacht den Sekundärschaden nach SHT (61). **Wu et al.** (159) beschreiben die Erhöhung der COX-2-Expression ab 15 min nach SHT: sie dauert bis zu einer Woche an und hat zwei Höhepunkte an Tag 1 und 3.

In vorliegender Studie kann eine Erhöhung der COX-2-Expression nach CCI nicht nachgewiesen werden. Lediglich in der SAB-Studie ist ein Anstieg der COX-2-Expression in der Veh-Gruppe im Vergleich zur Sh-NaCl-Gruppe feststellbar. Der in der Literatur bereits bekannte Einfluss von NSAIDs auf die COX-2-Expression soll im Weiteren vorgestellt werden: Ein Therapieansatz zur Reduzierung des Sekundärschadens nach SHT liegt in der Erforschung von verschiedenen COX-2 Inhibitoren, da sie die Bildung des Sekundärschadens verringern sollen (61). **Gopez et al.** (45) beschreiben bei der Ratte eine Verbesserung des neurologischen Outcomes nach diffusem SHT durch intraperitoneale Verabreichung eines COX-2-Inhibitors. Im Gehirn der Versuchstiere nach SHT kann nach Therapie mit COX-2-Inhibitoren eine Erniedrigung der COX-2-Expression gezeigt werden (45, 164). Der Vergleich von Ergebnissen verschiedener SHT-Tiermodelle, verschiedener NSAIDs und deren Dosierungen sollte mit Bedacht getätigt werden, da jedes Tiermodell eine unterschiedliche Art von Schaden hervorruft, der zudem verschiedene Ausprägungen annehmen kann. Des Weiteren

wirken verschiedene Medikamente unterschiedlich potent und der Einfluss der Genetik eines jeden Mausstammes bleibt zudem zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Studie kann eine signifikant niedrigere Expression von COX-2 nach SAB in der Bu-Gruppe im Vergleich zur Veh-Gruppe gezeigt werden. In der Literatur liegen keine Daten vor, die den Einfluss von Buprenorphin auf die COX-2-Expression nach SAB beschreiben.

6.1.4.3 iNOS

Laut den Ergebnissen dieser Studie kann kein signifikanter Einfluss der verwendeten Analgetika auf die hippocampale Expression von iNOS nach CCI und SAB gezeigt werden. Ein Anstieg der iNOS-Expression nach CCI liegt im Vergleich zu jeweils gleich therapierten Sham-Gruppen vor - dieser Anstieg ist lediglich tendenziell, jedoch in der Bu-Gruppe signifikant. Die Datenlage bezüglich der Expression von iNOS nach SHT ist in der Literatur kontrovers: **Petrov et al.** (105) zeigen, dass die maximale Expression von iNOS nach SHT vier Stunden posttraumatisch erfolgt und nach 24 h bereits zu 30%, nach 48 h zu 80% wieder abgebaut ist. **Thal et al.** (141) beschreiben ein Expressionsmaximum von iNOS 24 h nach CCI. Weitere Untersuchungen von **Iadecola et al.** (59) beschreiben ein Expressionsmaximum von iNOS nach SHT erst zum Zeitpunkt 96 h post CCI. Dass in vorliegender Studie lediglich ein tendenzieller Anstieg von iNOS nach SHT in den meisten Gruppen gezeigt werden kann, könnte an dem Untersuchungszeitpunkt (24 h posttraumatisch) liegen, der eventuell nicht die Maximalexpression von iNOS nach SHT widerspiegelt. Im SAB-Tiermodell kann in einer Studie von **Sayama et al.** (119), wie auch in vorliegender Studie, ebenfalls kein Anstieg von iNOS nach experimentell ausgelöster SAB an der Ratte gezeigt werden. Wohingegen Untersuchungen von **Widenka et al.** (157) eine Erhöhung der iNOS Expression nach SAB an der Ratte beschreiben.

6.1.5 SCORE-SYSTEME

6.1.5.1 Neuroscore

Der NS besteht aus verschiedenen Beobachtungskriterien, die den neurologischen Status eines Tieres beurteilen. Alle nach SHT auftretenden neurologischen Ausfallserscheinungen treten auf der kontralateral zum Schadensgebiet liegenden Seite auf (132), dies kann auch in vorliegender Studie bestätigt werden. Es werden nur Mäuse in die Studie aufgenommen, die präoperativ einen NS von 0 Punkten aufweisen, daher lässt sich die durch SHT ausgelöste Verschlechterung der neurologisch-motorischen Funktion der Mäuse feststellen. Der im NS verwendete Beam-Walking-Test kann laut **Markgraf et al.** (89) zur Ermittlung von neurologischen Veränderungen nach SHT eingesetzt werden.

In keiner der für diese Dissertation durchgeführten Studien wird der NS durch Buprenorphin, Carprofen oder Meloxicam signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die oben genannten Schmerzmittel die Entstehung der neurologischen Defizite nach SAB und CCI nicht verringern. Die histologische Auswertung der Nissl-Hirnschnitte bestätigt diese Ergebnisse: Histologisch kann ebenfalls keine Veränderung des Läsionsbereiches durch Analgetikatherapie nachgewiesen werden. In der Literatur liegen Studien von **Thau-Zuchmann et al.** (142), **Cernak et al.** (21) und **Hakan et al.** (48) über den Einfluss von Carprofen bzw. Meloxicam nach SHT vor. **Thau-Zuchmann et al.** (142) beschreiben eine Verbesserung des neurologischen Outcomes von Mäusen 24 h nach SHT durch die Therapie mit Carprofen. **Cernak et al.** (21) zeigen nach der Therapie mit COX-Inhibitoren eine verbesserte Wahrnehmungsfähigkeit und eine Verringerung der neurologischen Defizite nach SHT bei der Ratte. **Hakan et al.** (48) zeigen einen durch Meloxicam verbessertes neurologisches Outcome bei Ratten 48 h nach Auslösung des SHT. Im Gegensatz zu genannter Literatur zeigen **Dash et al.** (26) eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes bei Ratten nach SHT mit der Therapie von COX-2 Inhibitoren. Im Unterschied zu vorliegender Studie, in welcher ein fokales SHT ausgelöst wird, wird in den oben genannten Untersuchungen ein diffuses Modell des SHT erzeugt. Die unterschiedlichen Formen des SHT könnten ein Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse sein.

Des Weiteren kann nach SAB in einer Studie von **Ayer et al.** durch Therapie mit COX-2-Inhibitoren eine Verbesserung des neurologischen Outcomes der Ratten gezeigt werden. Auch bei dieser Studie handelt es sich um CD-1 Mäuse, das Fluid-Perussion-Trauma-Modell sowie einen anderen COX-2-Inhibitor. Aus diesem Grund kann kein Vergleich zu vorliegender Studie gezogen werden.

6.1.5.2 Komfortscore

Der KS ist ein Anhaltspunkt, um den Schmerzlevel der Mäuse einschätzen zu können. In dieser Studie hat die Analgetika-Therapie lediglich in der SAB-Studie einen Einfluss auf den KS-Level gezeigt. Durch die Analgetika Buprenorphin sowie Carprofen wird eine Verbesserung des KS nach SAB erzielt.

Es kann geschlussfolgert werden, dass diese beiden Analgetika das Unwohlsein lindern und das Schmerzniveau der Mäuse senken. Da Buprenorphin den KS-Level am weitesten senkt, sollte dies in künftigen SAB-Studien eingesetzt werden. **Flecknell et al.** (38) bezeichnen Buprenorphin als bestes Schmerzmittel für Tierversuche. Diese Aussage konnte durch die in dieser Studie durchgeführten SAB-Tierversuche bestätigt werden.

Der KS hat sich durch die Therapie mit Meloxicam im Vergleich zur nicht therapierten SAB-Veh-Gruppe nicht verringert. Eine Linderung der - durch die SAB auftretenden Schmerzen - durch Meloxicam ist somit unwahrscheinlich oder die Schmerzreduzierung ist so gering, dass sie mithilfe des KS nicht nachgewiesen werden kann. Ein weiterer Grund, dass nach Meloxicamtherapie kein schmerzlindernder Effekt sichtbar ist, könnte die Applikation von Meloxicam im 24 h-Rhythmus sein, während die anderen Analgetika alle 12 h appliziert werden. Eventuell ist die lediglich einmal tägliche analgetische Applikation nicht ausreichend. Ob eine Applikation von Meloxicam im 12 h-Rhythmus eine bessere analgetische Wirksamkeit hervorruft, muss in weiteren Studien geklärt werden. Die Applikation eines Schmerzmittels im 12 h-Rhythmus ist allerdings in vielen Laboren nicht praxistauglich auf Grund der Arbeitszeiten des Personals.

6.2 DISKUSSION WEITERER AUSGEWÄHLTER FRAGESTELLUNGEN ZUM THEMENBEREICH SCHMERZEN UND ANALGESIE BEIM VERSUCHSTIER

Im Folgenden wird auf den Unterschied im Schmerzlevel zwischen CCI und SAB eingegangen. Des Weiteren werden die verwendete und weitere Schmerzdetectionsmethoden diskutiert und deren Eignung in der Praxis erläutert. Abschließend erfolgt eine Diskussion der verwendeten Analgetika und der Dosierung dieser.

6.2.1 UNTERSCHIED IM SCHMERZLEVEL ZWISCHEN CONTROLLED-CORTICAL-IMPACT UND SUBARACHNOIDALBLUTUNG

Menschen mit einem SHT fühlen, abhängig vom Stärkegrad des Traumas verschieden starke Schmerzen. Bei dem in vorliegender Studie durch CCI hervorgerufenen SHT handelt es sich um ein moderates SHT. Die durch eine SAB-Erkrankung hervorgerufenen Schmerzen sind im Vergleich zu den Schmerzen eines moderaten SHT in der Regel hochgradig; laut Aussage überlebender SAB-Patienten sind dieserart nie erlebte stärkste Schmerzen von vernichtender Ausprägung (56).

Der Vergleich der beiden Studien stellt zwei Tiermodelle gegenüber, eines mit moderaten (CCI) und eines mit hochgradigen Schmerzen (SAB). Die posttraumatische Gewichtsabnahme der CCI-operierten Tiere, welche bei Sham-operierten Tieren nicht vorhanden ist, kann als deutliches Unwohlsein auf Grund des Traumas gedeutet werden. Dieses Unwohlsein kann auch mit Schmerzen assoziiert sein. Dass die SAB-Tiere ein größeres Unwohlsein-Schmerzniveau aufweisen als die CCI-Tiere spiegelt die Schmerzbelastung der zwei Erkrankungen wieder. Auch in der Empfindung des Menschen erzeugt SAB einen unvergleichlich höheren Schmerzgrad als ein moderates SHT.

Die Verbesserung des KS nach analgetischer Behandlung im SAB-Versuch lässt den Rückschluss zu, dass das durch die OP hervorgerufene Schmerzempfinden und Unwohlsein durch die Therapie deutlich reduziert wird. Beim SHT ist das Unwohlsein-Schmerzniveau geringer als bei der SAB was an den niedrigeren Werten im KS im Vergleich zu den CCI-KS-Werten sichtbar ist. Eine Verminderung des Schmerzniveaus nach CCI durch Analgesie kann nicht mithilfe des KS gezeigt werden, da dieser entweder nicht sensibel genug ist, um minimal unterschiedliche Schmerzlevel voneinander zu unterscheiden oder keine Schmerzreduktion eintritt.

6.2.2 SCHMERZDETEKTIONSMETHODEN BEIM VERSUCHSTIER

6.2.2.1 Systeme zur Schmerzdetektion

Schmerzen sind eine subjektive Empfindung und können bei Tieren schwer ermittelt werden. In Forschung und Tiermedizin bedient man sich verschiedener Systeme, um Schmerzlevel zu ermitteln. Neben Befragung der Besitzer in der Tiermedizin werden in der Forschung verschiedene Score-Systeme angewendet. Die verwendeten Score-Systeme betrachten abhängig von der Tierart und deren Verhaltensweise, Parameter wie Grabe- und Nestbauaktivität, Gesichtsmimik und Gestik, Körperhaltung, Bewegungsaktivität, Fellpflegezustand und viele weitere Parameter.

In der vorliegenden Studie bedient man sich des KS. Vorteile eines jeden Score-Systems sind schnelle Durchführbarkeit und Erfassung vieler verschiedener Parameter. Die in dieser Studie betrachteten Parameter des KS geben Aufschluss über das Allgemeinbefinden des Versuchstieres, können aber nur subjektiv vom jeweiligen Untersucher beurteilt werden. Der Hauptnachteil der Score-Systeme ist somit die fehlende Objektivität.

Ein anderer Weg zur Bestimmung physiologischer Parameter, um das Schmerzlevel bei Mäusen zu bestimmen ist der Einsatz von Telemetrie. Ein Telemetrie-System beinhaltet eine Sonde, die der Maus intraabdominal eingesetzt wird. Die Mäuse werden in speziellen Telemetrie-Käfigen gehalten. Die Sonde misst kontinuierlich verschiedene Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck, Puls, Atemfrequenz, Bewegungsintensität, Körpertemperatur u.a. Abhängig von dem Sondentyp können vier bis fünf Parameter gleichzeitig ermittelt werden. Im Vergleich zu dem verwendeten KS ist die Telemetrie sehr zeitaufwendig. Ein Vorteil der Telemetrie im Vergleich zu einem, wie in vorliegender Studie verwendeten Score-System, ist die Möglichkeit kontinuierlich große Datenmengen physiologischer Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur zu erheben. Des Weiteren können Parameter wie Körpergewicht und die Aktivität der Tiere ebenfalls kontinuierlich erfasst werden. Für eine Schmerzstudie hat die Telemetrie im Vergleich zum Score-System auch Nachteile. Die für eine Maus verhältnismäßig große Telemetrie-Sonde wird in einer OP intraabdominal eingesetzt. Neben den durch die Telemetrie-OP entstehenden Schmerzen kann ein Unwohlsein durch die große implantierte Sonde, also eine Verhaltensänderung aufgrund der Implantation - und nicht aufgrund des eigentlichen Tiermodells - nicht ausgeschlossen werden. Zur aufwendigen Telemetrie-Sonden-OP kommt zusätzlich eine Zeitdauer von ungefähr drei Wochen, bis die Sonde komplett eingeeilt ist. Die genannten Nebeneffekte treten durch den Einsatz eines Score-Systems nicht auf.

Trotz der Vielfalt an Parametern, die eine Telemetrie erfasst, können auch mit dieser Sonde Schmerzen nicht direkt gemessen werden. Aufgrund der genannten Nachteile und wegen des Kostenaspekts eines teuren Telemetrie-Systems wird in vorliegender Studie auf dieses System verzichtet.

6.2.2.2 Eignung von Blutparametern zur Schmerzdetektion

Wie im Kapitel 2.4.3 dargestellt, ist die Detektion von Schmerzen bei Tieren bis heute schwierig. Die in Tierversuchen häufig verwendeten Tiere wie Maus, Ratte und Kaninchen zeigen kaum Schmerzreaktionen. **Zöls** (163) und **Breitinger** (17, 163) verwenden Blutparameter wie Katecholamine, Cortisol und Corticosteron, um den Schmerzlevel vom Versuchstier Schwein zu beurteilen.

Es existieren biochemische und endokrine Parameter, wie Blut-Corticosteron oder Cortison Konzentrationen, Katecholamin-Konzentrationen sowie Substanz P-Konzentrationen, die der gängigen Literatur nach entsprechend auf Schmerzen hinweisen können. **Church** (23) zeigt in seiner Studie, dass beim Menschen sowohl Katecholamin- als auch Cortisollevel nicht mit dem postoperativen Schmerzlevel des Patienten korrelieren; auch **Kehlet** (71) und **Moller et al.** (96) kommen zu dem Ergebnis, dass sowohl Glukose als auch Cortisol-Konzentration Veränderungen im Blut nach analgetischer Behandlung beim Menschen nicht signifikant sind. Trotz dieser Ergebnisse humanmedizinischer Studien, die zeigen, dass Schmerzempfinden und Blutparameter nicht korrelieren, existieren veterinärmedizinische Studien, die sich der Blutparameter Katecholamin, Cortisol und Glukose bedienen. Beim Schwein wird in Experimenten von **Langhoff** (79), **Zöls** (163) und **Übel** (150) Cortisol zur Schmerz- und Stresserkennung verwendet. Ein Anstieg des Blut-Cortisollevels beim Schwein aufgrund von schmerzhaften Eingriffen ist zudem in einer Studie von **Lahrman et al.** (78) nachgewiesen worden, jedoch auch nicht schmerzhaftere Ereignisse wie kurzzeitiger Stress durch Einfangen der Tiere erhöhen den Blut-Cortisolspiegel bei Schweinen (112) – sodass die Interpretation von scheinbar signifikanten Veränderungen physiologischer Parameter generell vorsichtig getätigt werden sollte.

Unabhängig davon, ob Cortisol als ein geeigneter Schmerzparameter bewertet werden kann oder nicht, müssen zur Ermittlung eines realistischen Wertes mehrere Messungen zu verschiedenen Versuchszeitpunkten durchgeführt werden, um eine aussagekräftige Aussage zu erhalten, da sowohl individuelle Schwankungen als auch eine Vielzahl an Stressoren einen Einfluss auf diesen Wert haben können (120). Da die mehrmalige Blutentnahme bei der Maus durch ihr begrenztes Blutvolumen nicht möglich ist und zudem diese Maßnahme bei

einer durch die OP geschwächten Maus großen Einfluss auf den KS haben könnte, wird in der vorliegenden Studie kein Blut zur Cortisolbestimmung entnommen.

6.2.3 VERWENDETE ANALGETIKA

Die Wirkstoffe Buprenorphin, Carprofen und Meloxicam werden in dieser Studie ausgewählt, da diese potenten Analgetika bereits in verschiedenen Tierversuchen verwendet wurden (51, 149, 158). In diesem Versuch werden nicht die reinen Wirkstoffe, sondern kommerzielle Medikamente (Temgesic®, Rimadyl® und Metacam®) verwendet. Die verwendeten Präparate enthalten deshalb weitere Zusatz- sowie Hilfsstoffe. Die in vorliegender Studie nachgewiesenen Effekte der Medikamente können den Wirkstoffen zugeschrieben werden, aber auch auf einer Wirkung der Zusatz- und Hilfsstoffe beruhen.

In der Vorauswahl der Wirkstoffe war die Vermutung gegeben, dass COX-Inhibitoren (Carprofen und Meloxicam) wegen ihrer entzündungshemmenden Wirkung, die Entstehung des Sekundärschadens reduzieren könnten. In der Verwendung von Opioiden (z.B. Buprenorphin) besteht diese Problematik hingegen nicht. Dies stellt einen Vorteil der Therapie mit Opioiden im Vergleich zu der Therapie mit NSAIDs dar. Nachteilig bei einer Therapie mit Buprenorphin hingegen ist, dass es unter das Betäubungsmittelgesetz fällt und somit jede verabreichte Injektion genau dokumentiert werden muss. Eine solche Dokumentation stellt einen Mehraufwand in der Praxis dar.

Die beschriebene Möglichkeit, dass COX-Hemmer durch ihre entzündungshemmende Wirkung den Schaden reduzieren können, wurde durch die Therapie von Carprofen in einer Untersuchung von **Thau-Zuchmann et al.** (142) 90 Tage nach SHT in der Maus beschrieben. Im Vergleich dazu kann in vorliegender Studie keine Beeinflussung der Schadensgröße zum Zeitpunkt fünf Tage nach Trauma auf Grund der Carprofentherapie gezeigt werden. Die Dosis und Verabreichungsart jeder Carprofeninjektion ist in beiden Studien dieselbe, jedoch wird in vorliegender Studie ein Dosierungsintervall von zwölf Stunden gewählt mit einer Therapiedauer von drei Tagen. Im Vergleich dazu therapieren **Thau-Zuchmann et al.** (142) ihre Versuchstiere lediglich einmal täglich für eine Therapiedauer von sieben Tagen.

6.2.4 DOSIERUNG UND APPLIKATIONSINTERVALL DER ANALGETIKA

In vorliegender Studie wird bei den Wirkstoffen Buprenorphin und Carprofen ein Applikationsintervall von 12 Stunden gewählt. Meloxicam wird lediglich alle 24 Stunden verabreicht.

Diese Dosierung beruht auf der Dosierungsempfehlung der GV-Solas (5). Offen und Grundlage (zukünftiger) Studien bleibt die Frage, ob eine analgetische Wirksamkeit, wie dies bei Carprofen der Fall ist, bei häufigerer Applikation von Meloxicam erreicht werden kann.

Bei allen drei verwendeten Wirkstoffen bleibt des Weiteren offen, ob mit den verwendeten Dosierungen ein durchgehend therapeutischer Blutplasmaspiegel in den C57Bl/6-Mäusen erreicht werden kann. Zu den verwendeten Wirkstoffen liegen nach subkutaner Applikation in der Literatur keine Pharmakokinetikdaten bei C57Bl/6-Mäusen vor. In einer Untersuchung von **Busch et al.** (20) wird die Pharmakokinetik von radioaktiv markiertem Meloxicam an männlichen Albino-Mäusen nach oraler und intravenöser Gabe dargestellt. Nach einer einmaligen Verabreichung von 10 mg/kg ist die Plasmaeliminationshalbwertszeit bei diesen Mäusen um wesentliches geringer als bei Ratten, Hunden oder Minipigs. Sie beträgt nach intravenöser Gabe 6,4 Stunden und nach oraler Gabe 4,8 Stunden. Ein vergleichbarer Blutdosisspiegel nach oraler und venöser Applikation ist ab einer Stunde nach Verabreichung vorhanden. In einer Publikation von **Yu et al.** (160) wird die Pharmakokinetik von Buprenorphin an weiblichen CD-1-Mäusen gezeigt. In dieser Untersuchung wird Buprenorphin jedoch intravenös verabreicht und nicht subkutan wie in vorliegenden Versuchen. Zur Pharmakokinetik von Carprofen in der Maus liegen in der Literatur keine Daten vor. Eine Überwachung der Wirkstoffkonzentration der Analgetika im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten wäre ideal zum Nachweis eines therapeutisch notwendigen Wirkstoffspiegels. Dies konnte jedoch wegen fehlender Gerätschaften und hohem Kostenaufwand in unserem Versuch nicht durchgeführt werden.

Eine selbstbestimmte orale analgetische Therapie, wie diese von manchen Forschern (136) in Tierversuchen angewendet wird, sollte nach den Ergebnissen dieser Studie bei SAB operierten Mäusen nicht verwendet werden, da die SAB-operierten Tiere trotz analgetischer Therapie ihre Futteraufnahme vollständig einstellen. Daher würden sie selbst bei frei verfügbaren oralen Analgetika im Futter postoperativ kein Schmerzmittel aufnehmen.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss von perioperativer Analgesie nach SHT und SAB bei der Maus auf sekundäre pathophysiologische Prozesse sowie Schmerzbelastung der Versuchstiere untersucht. In den Untersuchungen im CCI- und SAB-Tiermodell hat sich gezeigt, dass HW-Gehalt, histopathologischer Schaden, Mikrogliaaktivierung und neurologisches Outcome der Mäuse nicht durch Analgetika beeinflusst werden. Weder motorisch-neurologische Tests noch die Histologie zeigen zwischen den analgetisch therapierten und nicht therapierten Versuchsgruppen signifikante Unterschiede. Die Ergebnisse von **Thau-Zuchmann et al.** (142) können somit nicht bestätigt werden.

Es existieren zahlreiche Studien, die die Wirksamkeit von Buprenorphin bei schmerzhaften Eingriffen an der Maus bestätigen (25, 149). In vorliegender Studie kann diese Wirkung für das SAB-Tiermodell nachgewiesen werden, für das CCI-Tiermodell hingegen nicht. Carprofen ist nach SAB ebenfalls wirksam, allerdings ist es nicht so potent wie Buprenorphin. Beim zuletzt betrachteten Wirkstoff Meloxicam kann für beide Tiermodelle keine Wirksamkeit nachgewiesen werden. Nachdem von den drei angewendeten analgetischen Wirkstoffen zwei eine schmerzlindernde Wirkung nach SAB zeigen, ohne die pathophysiologischen Parameter analgetikaabhängig signifikant zu verändern, sollten im SAB-Tiermodell Schmerzmittel eingesetzt werden. Da Buprenorphin in vorliegender Studie die beste analgetische Wirksamkeit aufweist, empfiehlt sich der Einsatz dieses Wirkstoffes primär nach SAB.

Im CCI-Tiermodell werden laut vorliegender Studien ebenfalls Schmerzen gezeigt. Die Eignung der verwendeten Analgetika wird nach CCI nicht nachgewiesen, ein analgetisch wirksames Medikament sollte in weiteren Studien gesucht werden. Ein Grund für die nicht nachgewiesene Wirksamkeit könnte der verwendete KS sein, welcher für das CCI-Tiermodell mit moderatem Anfangsschmerzniveau nicht präzise genug ist. Für zukünftige Studien sollte dieser Score verfeinert werden, um auch die Linderung moderater Schmerzen beurteilen zu können.

Mit **Arras et al.** (5) bin ich der Meinung, dass Projekte mit Tierversuchen mit einer zusätzlich analgetisch behandelten Versuchsgruppe gestaltet werden sollten, um den Einfluss der Analgetikatherapie bei weiteren Tierversuchsmodellen zu erforschen. Dadurch würden sowohl die für die Forschung nötigen Erkenntnisse gewonnen als auch mit geringem zusätzlichem Aufwand die moralisch-ethischen Bedenken über Tierversuche gemildert werden können.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Bis heute sind Tierversuche ein wichtiges und häufig verwendetes Instrument der Wissenschaft, um die Pathophysiologie von Erkrankungen und deren Behandlung zu erforschen. Viele Versuchstiere in der humanmedizinischen Forschung erhalten nach operativen Eingriffen zur Induktion neurologischer Erkrankungen keine Analgetikatherapie. Begründet wird dieses mit der unzureichenden experimentellen Datenlage. Derzeit existiert keine Evidenz, welche Analgetika suffizient in Mausmodell wirken und gleichzeitig die experimentelle Untersuchung gering bzw. nicht beeinflussen. In dieser Dissertation wird in zwei verschiedenen zerebralen Krankheitsmodellen zur Untersuchung der Folgen des Schädel-Hirn-Traumas mit Hilfe des Controlled-Cortical-Impact (CCI) Modells und der Subarachnoidalblutung mit Hilfe des Fadenperforationsmodells (SAB) der Einfluss der Analgetika Buprenorphin, Carprofen und Meloxicam auf die Schmerzbelastung des Versuchstieres Maus und auf pathophysiologische Endpunkte untersucht.

Die Schmerzbelastung der Tiere wird mithilfe eines Komfortscores (KS), der Körpergewichtsentwicklung und der Futteraufnahme der Mäuse gemessen. Als Endpunkte zur Beurteilung des Einflusses auf sekundäre pathophysiologische Prozesse dienen die Bestimmung von HW-Gehalt, histopathologischen Schaden, Mikrogliaaktivierung, neurologische Funktion und die Expression der Inflammationsparameter IL-6, COX-2 und iNOS.

Nach SAB bewirkt die Therapie mit Buprenorphin oder Carprofen eine signifikante Verbesserung des KS, welches auf eine effektive Analgesie deutet. Die Tiere zeigen nach SAB unabhängig von der Therapie bis zum Zeitpunkt 24 Stunden postoperativ keine Futteraufnahme. Die Verbesserung im KS geht nicht mit einer früheren bzw. besseren Futteraufnahme einher. Die Analgesie ist somit nicht ausreichend bzw. die neurologischen Defizite limitierend, so dass eine Futteraufnahme nicht möglich ist. Eine schmerzreduzierende Wirkung nach CCI ist mit dem KS nicht darstellbar. Der Gewichtsverlust ist im Vergleich zur SAB deutlich geringer und die Futteraufnahme nur gering eingeschränkt. Die weiteren Ergebnisse der Experimente zeigen, dass Buprenorphin, Carprofen und Meloxicam nach SAB keinen Einfluss auf die Neurologie haben.

Nach CCI ist HW-Gehalt, Schadensgröße, neurologische Funktion und Mikrogliaaktivierung nicht signifikant zwischen den Therapiegruppen unterschiedlich. Die Quantifikation der inflammatorischen Zielgene IL-6 und iNOS ergibt in beiden Tiermodellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dem Gegenüber ist die Expression von COX-2 nach SAB in der Buprenorphin Gruppe signifikant verringert. Diese Daten deuten auf einen geringen Einfluss der Analgetika auf die untersuchten sekundären Endpunkte nach SAB hin.

Zusammenfassend zeigen die gewählten Tiermodelle unterschiedliche Veränderungen im KS. Während der KS als Ausdruck des Wohlbefindens nach SAB deutlich eingeschränkt ist und durch Gabe von Buprenorphin oder Carprofen signifikant verbessert wird, zeigen Tiere nach CCI einen gering eingeschränkten KS, welcher durch Analgetika Gabe nicht verbessert werden kann. Da durch Gabe der Analgetika die sekundären Endpunkte Histologie, Hirnwassergehalt und neurologische Funktion nicht verändert sind, sollte zur Linderung der Belastung eine Analgesie für Tiere mit SAB durchgeführt werden. Leider ist das verwendete Applikationsprotokoll aufgrund des 12 Stunden Spritz-Abstands technisch schwierig umsetzbar. Deshalb sind zukünftig weitere Experimente notwendig, um eine einfach anwendbare und effektive Analgesie bei Versuchstieren nach SAB zu entwickeln.

9 SUMMARY

Animals are an important valuable scientific tool, which help to investigate underlying mechanisms of human diseases. Most laboratory animals do not receive an analgesic treatment after induction of e.g. neurological diseases due to insufficient data on optimal use /dosage and unknown impact of drug treatment on experimental outcome parameters. In this dissertation the influence of analgesia (buprenorphin, carprofen or meloxicam) on pain level and pathophysiological changes is analyzed in two cerebral lesion models: the “Controlled cortical impact” mouse model for traumatic brain injury and the filament perforation model to investigate “subarachnoid hemorrhage” (SAH).

The pain level is assessed with a comfort score (KS) and by quantification of body weight and food uptake. To determine the influence of the analgesic agents on pathophysiological processes brain water content, brain lesion volume, number of activated microglia cells, neurological function score, as well as expression levels of the inflammatory marker genes IL-6, COX-2, and iNOS have been determined.

The experimental results show that buprenorphin and carprofen significantly improve KS in SAH animals. This indicates that treatment does relieve stress to the animals as result of an effective analgesia. Independent of the analgesic regimen, the animals do not eat within the first 24 hours after surgery. Improvement in KS is therefore not associated with improved food uptake and weight gain. This may be due to insufficient analgesia or neurocognitive deficits following SAH, which may hamper the animals from eating and drinking. In contrast to SAH, analgesic treatment does not alleviate pain levels after CCI. Body weight loss and limited food uptake is less prominent after CCI compared to SAH. Further results show that buprenorphin, carprofen and meloxicam do not influence brain water content, lesion size, and microglia activation after CCI. In both animal models (CCI and SAH), neurological outcome is not different between analgesia-treated and non-treated mice. The expression levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and iNOS) are not significant different between experimental groups after SAH and CCI. The only difference is present in buprenorphin treated animals showing attenuated COX-2 levels compared to vehicle treated SAH animals.

In summary the two animal models demonstrate different degrees of KS changes, which indicate that the models cause different stress levels. Importantly, KS was significantly improved after SAH by buprenorphin or carprofen, while minor KS changes after CCI were not influenced by analgesic therapy. Therefore, analgesia should be applied to all SAH animals. Especially, as no significant effect of analgesia on histological brain damage, brain water content and neurological function was detected in this study. Unfortunately the applied study

protocol requires a 12-hourly injection of drug, which is recommended by the German GV-Solas (5). It will therefore be difficult to apply this protocol in routine laboratory work. Future research is therefore necessary to develop an effective and applicable protocol for mice.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Arterielle Blutgefäßversorgung des Gehirns	- 8 -
Abbildung 2:	Zeitliche Entwicklung des Schadens nach SHT	- 12 -
Abbildung 3:	Fluid-Percussion-Modell.....	- 14 -
Abbildung 4:	Häufigste Lokalisationen von Aneurysmen der basalen Hirnarterien beim Menschen	- 16 -
Abbildung 5:	Strukturformel von Carprofen.....	- 26 -
Abbildung 6:	Strukturformel von Meloxicam.....	- 27 -
Abbildung 7:	Strukturformel von Buprenorphin	- 29 -
Abbildung 8:	Mikroglia und ihre Effekte.....	- 33 -
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Studien CCI-24 h und SAB-24 h.....	- 50 -
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Studie CCI-5 d.....	- 51 -
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des CCI-Modells mit Ansatzstelle des CCI-Impactors	- 54 -
Abbildung 12:	CCI-Impactor (Neurotrauma-Erzeugungs-Anlage).....	- 55 -
Abbildung 13:	Codman ICP microsensor und ICP-Sondenkopf.....	- 56 -
Abbildung 14:	Darstellung der ICP Messposition und Laser-Doppler-Sonden..... Messposition bei SAB	- 57 -
Abbildung 15:	SAB-OP; Lagerung und schematische Darstellung der frei präparierten Arterien	- 58 -
Abbildung 16:	Fadenführung in der SAB-OP	- 59 -
Abbildung 17:	Frisch entnommenes Mäusegehirn mit CCI-Schaden, Schnittschema zur Gewinnung der benötigten Gehirnabschnitte	- 61 -
Abbildung 18:	Nach Nissl gefärbter Beispielschnitt.....	- 65 -
Abbildung 19:	Iba-1 gefärbter Beispielschnitt.....	- 67 -
Abbildung 20:	IgG gefärbter Beispielschnitt	- 68 -
Abbildung 21:	Drei Fluoreszenzkurven einer Verdünnungsreihe und die resultierenden Crossingpoints auf der Regressionsgeraden	- 73 -
Abbildung 22:	CCI 24-h-Studie – HW-Gehalt der CCI-operierten Versuchsgruppen: ipsilaterale Hemisphäre und contralaterale Hemisphäre	- 82 -

Abbildung 23:	CCI-24 h-Studie – HW-Gehalt der Sham-operierten	
	Versuchsgruppen: ipsilaterale Hemisphäre und	
	contralaterale Hemisphäre	- 83 -
Abbildung 24:	CCI-5 d-Studie - Postoperatives Kontusionsvolumen	- 84 -
Abbildung 25:	CCI-5 d-Studie - Gesamtmikrogliazahl der ausgezählten Felder	- 85 -
Abbildung 26:	CCI-24 h-Studie - Körpergewichte in % des Ausgangsgewichts	
	der CCI-operierten Mäuse.....	- 86 -
Abbildung 27:	CCI-5 d-Studie - Tägliche Körpergewichte der Mäuse in % des	
	Ausgangsgewichts	- 87 -
Abbildung 28:	SAB-24 h-Studie - Körpergewichte in % des Ausgangsgewichts	
	der Mäuse	- 88 -
Abbildung 29:	CCI-24 h-Studie – Tägliche Futterraufnahme pro 1 g	
	Körpergewicht	
	der CCI-operierten Versuchsgruppen	- 89 -
Abbildung 30:	CCI-5 d-Studie - Tägliche Futterraufnahme pro 1 g	
	Körpergewicht	- 90 -
Abbildung 31:	SAB-24 h-Studie - Tägliche Futterraufnahme pro 1 g	
	Körpergewicht	- 91 -
Abbildung 32:	Entwicklung des ICP während der SAB-OP in allen	
	SAB-Versuchsgruppen.....	- 93 -
Abbildung 33:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6	
	(in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen.....	- 94 -
Abbildung 34:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6	
	(in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen.....	- 95 -
Abbildung 35:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2	
	(in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen.....	- 96 -
Abbildung 36:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2	
	(in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen.....	- 96 -
Abbildung 37:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS	
	(in % Sh-NaCl) in den CCI-operierten Versuchsgruppen.....	- 98 -
Abbildung 38:	CCI-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS	
	(in % Sh-NaCl) in den Sham-operierten Versuchsgruppen.....	- 98 -
Abbildung 39:	SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers IL-6	
	(in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen	- 100 -
Abbildung 40:	SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers COX-2	
	(in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen	- 101 -

Abbildung 41:	SAB-24 h-Studie - Expression des Inflammationsmarkers iNOS (in % Sh-NaCl) in den Versuchsgruppen - 102 -
Abbildung 42:	CCI-24 h-Studie - Postoperativer NS der Versuchsgruppen..... - 103 -
Abbildung 43:	CCI-5 d-Studie – Täglicher postoperativer NS der Versuchsgruppen - 104 -
Abbildung 44:	SAB-24 h-Studie - Postoperativer NS der Versuchsgruppen..... - 105 -
Abbildung 45:	CCI-24 h-Studie - Postoperativer KS der Versuchsgruppen..... - 106 -
Abbildung 46:	CCI-5 d-Studie - Täglicher postoperativer KS der Versuchsgruppen - 107 -
Abbildung 47:	SAB-24 h-Studie - Postoperativer KS der Versuchsgruppen..... - 108 -

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Materialauflistung – Geräte	- 38 -
Tabelle 2:	Materialauflistung – Verbrauchsmaterialien	- 40 -
Tabelle 3:	Materialauflistung – Software	- 41 -
Tabelle 4:	Materialauflistung – Chemikalien.....	- 41 -
Tabelle 5:	Materialauflistung – Puffer und Lösungen	- 42 -
Tabelle 6:	Materialauflistung – Arzneimittel.....	- 42 -
Tabelle 7:	Materialauflistung – Kits	- 43 -
Tabelle 8:	Materialauflistung – Primer	- 43 -
Tabelle 9:	Materialauflistung – Sonden	- 44 -
Tabelle 10:	Materialauflistung – Antikörper	- 44 -
Tabelle 11:	Versuchsgruppen mit Überlebenszeit und Tierzahlen	- 48 -
Tabelle 12:	Neuroscore	- 77 -
Tabelle 13:	Komfortscore	- 80 -
Tabelle 14:	Prämortale Hämoglobin-Blutwerte aller Studien.....	- 92 -
Tabelle 15:	Prämortale Hämatokrit-Blutwerte aller Studien	- 92 -
Tabelle 16:	Prämortale Blutglukosewerte aller Studien.....	- 93 -

12 LITERATURVERZEICHNIS

1. Carprofen- Pharmakologie
http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?wir/00005371/6497_05.htm?wir/00005371/6497_00.htm.
2. **Adamson TW, Kendall LV, Goss S, Grayson K, Touma C, Palme R, Chen JQ, and Borowsky AD.** Assessment of carprofen and buprenorphine on recovery of mice after surgical removal of the mammary fat pad. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 49: 610-616, 2010.
3. **Alder J, Fujioka W, Lifshitz J, Crockett DP, and Thakker-Varia S.** Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J Vis Exp* 2011.
4. **Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615, 2001.
5. **Arras M, Becker K, Eberspächer E, Haberstroh J, Henke J, and M. S.** Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. *GV-Solas Ausschuss für Anaesthesie, Analgesie und Schmerzprophylaxe* 11, 2010.
6. **Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, and Burki K.** Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res* 3: 16, 2007.
7. **Ayer R, Jadhav V, Sugawara T, and Zhang JH.** The neuroprotective effects of cyclooxygenase-2 inhibition in a mouse model of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 111: 145-149, 2011.
8. **Baethmann A, Wirth A, and Schlesinger-Raab A.** Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur Surg Res* 34: 42-46, 2002.
9. **Bareyre F, Wahl F, McIntosh TK, and Stutzmann JM.** Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. *Journal of neurotrauma* 14: 839-849, 1997.
10. **Baskaya MK, Rao AM, Dogan A, Donaldson D, and Dempsey RJ.** The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 226: 33-36, 1997.
11. **Bayer.** Packungsbeilage Buprenovet <http://www.pharmazie.com/graphic/A/49/8-00749.pdf>.
12. **Becker K.** SOP Möglichkeiten der postoperativen analgetischen Behandlung. Heidelberg: Universität Heidelberg, 2005, p. 4.
13. **Bederson JB, Germano IM, and Guarino L.** Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke* 26: 1086-1091; discussion 1091-1082, 1995.
14. **Behrends, Bischofberger, Deutzmann, and Ehmke.** *Physiologie 93 Tabellen*. Stuttgart: Thieme, 2010, p. 204.
15. **Blaaha MD, and Leon LR.** Effects of indomethacin and buprenorphine analgesia on the postoperative recovery of mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 47: 8-19, 2008.
16. **Bouma GJ, Muizelaar JP, and Fatouros P.** Pathogenesis of traumatic brain swelling: role of cerebral blood volume. *Acta Neurochir Suppl* 71: 272-275, 1998.
17. **Breitinger I.** Untersuchung über den Einsatz von Brotizolam zur Reduktion kastrationsbedingter Schmerzen beim männlichen Saugferkel. In: *Schweineklinik*. München: LMU, 2009.

18. **Budras K-D.** *Atlas der Anatomie des Hundes Lehrbuch für Tierärzte und Studierende.* Hannover: Schlüter, 2007, p. 90.
19. **Bühling KJ, Lepenies J, and Witt K.** *Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie.* München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer, 2008, p. 343.
20. **Busch U, Schmid J, Heinzl G, Schmaus H, Baierl J, Huber C, and Roth W.** Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. *Drug Metab Dispos* 26: 576-584, 1998.
21. **Cernak I, O'Connor C, and Vink R.** Inhibition of cyclooxygenase 2 by nimesulide improves cognitive outcome more than motor outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res* 147: 193-199, 2002.
22. **Choyne-Robertson S.** Der Einfluss des PPARy Agonisten Pioglitazon auf den neuronalen Schaden bei der Ratte nach CCI (Controlled Cortical Impact). In: *Klinik für Anästhesiologie.* Mainz: Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2011, p. 84.
23. **Church S.** Understanding Pain and its Relevance to Animals. 7, 2000.
24. **Cole JT, Yarnell A, Kean WS, Gold E, Lewis B, Ren M, McMullen DC, Jacobowitz DM, Pollard HB, O'Neill JT, Grunberg NE, Dalgard CL, Frank JA, and Watson WD.** Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *Journal of neurotrauma* 28: 359-369, 2011.
25. **Coulter CA, Flecknell PA, Leach MC, and Richardson CA.** Reported analgesic administration to rabbits undergoing experimental surgical procedures. *BMC Vet Res* 7: 12, 2011.
26. **Dash PK, Mach SA, and Moore AN.** Regional expression and role of cyclooxygenase-2 following experimental traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 17: 69-81, 2000.
27. **Dietz H-G.** Schädel-Hirn-Trauma. In: *Kinderchirurgie*, edited by Dietz H-G Springer, 2009, p. 159.
28. **Dirnagl U, Iadecola C, and Moskowitz MA.** Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397, 1999.
29. **Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, and Hayes RL.** A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39: 253-262, 1991.
30. **Donkin JJ, and Vink R.** Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol* 23: 293-299, 2010.
31. **Dörner K.** *Klinische Chemie und Hämatologie 69 Tabellen.* Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2006, p. 334.
32. **Engelhard K, Werner C, Reeker W, Lu H, Mollenberg O, Mielke L, and Kochs E.** Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *British journal of anaesthesia* 83: 415-421, 1999.
33. **Ernst A, Herzog M, and Seidl RO.** *Traumatologie des Kopf-Hals-Bereichs: 50 Tabellen/ Arne Ernst; Michael Herzog; Rainer Ottis Seidl. Unter Mitarb. von K.-L. Kiening.* Stuttgart; New York: Thieme: 2004, p. 38.
34. **Everts B, Wahrborg P, and Hedner T.** COX-2-Specific inhibitors-the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin Rheumatol* 19: 331-343, 2000.
35. **Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, and Dail WG.** Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 211: 67-77, 1981.
36. **Feiler S, Friedrich B, Scholler K, Thal SC, and Plesnila N.** Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring. *J Neurosci Methods* 190: 164-170, 2010.

37. **Flecknell PA.** Laboratory Animal Anaesthesia [electronic resource]. Burlington: Elsevier, 1996.: 1996, p. p. 150.
38. **Flecknell PA.** The relief of pain in laboratory animals. *Lab Anim* 18: 147-160, 1984.
39. **Flecknell PA, Orr HE, Roughan JV, and Stewart R.** Comparison of the effects of oral or subcutaneous carprofen or ketoprofen in rats undergoing laparotomy. *Vet Rec* 144: 65-67, 1999.
40. **Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, and Shohami E.** Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nature protocols* 4: 1328-1337, 2009.
41. **Fraser PA.** The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 51: 967-977, 2011.
42. **Frey H, and Löscher W.** *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin 131 Tabellen.* Stuttgart: Enke, 2007, p. 105, 116.
43. **Freye.** Opioide in der Medizin. 8. Auflage: 10, 2010, p. 10.
44. **Gallacchi G.** *Schmerzkompandium: Schmerzen verstehen und behandeln; 36 Tabellen/ hrsg. von Guido Gallacchi und Beatrice Pilger. Mitbegr. von René Bader. Unter Mitarb. von K. Bruppacher. Koautoren W. Böhny.* Stuttgart; New York: Thieme: 2005. p. 127.
45. **Gopez JJ, Yue H, Vasudevan R, Malik AS, Fogelsanger LN, Lewis S, Panikashvili D, Shohami E, Jansen SA, Narayan RK, and Strauss KI.** Cyclooxygenase-2-specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* 56: 590-604, 2005.
46. **Grundmann.** *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie [mit virtuellem Mikroskop online].* München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer, 2010, p. 508.
47. **Gutermuth LP, M.** Schockraum Management, Organisation und Patientenversorgung. edited by Gutermuth LUrban & Fischer, 2009.
48. **Hakan T, Toklu HZ, Biber N, Ozevren H, Solakoglu S, Demirturk P, and Aker FV.** Effect of COX-2 inhibitor meloxicam against traumatic brain injury-induced biochemical, histopathological changes and blood-brain barrier permeability. *Neurol Res* 32: 629-635, 2010.
49. **Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O, and Morganti-Kossmann MC.** Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 184-194, 1999.
50. **Harting MT, Jimenez F, Adams SD, Mercer DW, and Cox CS, Jr.** Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery* 144: 803-813, 2008.
51. **Hayes KE, Raucci JA, Jr., Gades NM, and Toth LA.** An evaluation of analgesic regimens for abdominal surgery in mice. *Contemp Top Lab Anim Sci* 39: 18-23, 2000.
52. **Heinemann M.** Einfluss von Pioglitazon und Rosiglitazon auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. In: *Klinik für Anästhesiologie.* Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2009, p. 62.
53. **Heinen FB, I.** Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter. 2007, p. 1724.
54. **Henke J, and Erhard W** editors. *Schmerzmanagement bei Klein- und Heimtieren.* Stuttgart: Enke Verlag 2011, p. p.16-17.
55. **Herdegen T.** Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie: 328 Tabellen/ Thomas Herdegen. Unter Mitarb. von Ruwen Böhm. In: *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie: 328 Tabellen/ Thomas Herdegen Unter Mitarb von Ruwen Böhm,* edited by Herdegen T. Stuttgart; New York, NY: Thieme: 2008, p. 272.

56. **Hermann DM, and Arnold M.** *Vaskuläre Neurologie: zentrale Ischämien, Hämorrhagien, Gefäßmissbildungen, Vaskulitiden und vaskuläre Demenz; 51 Tabellen/ hrsg. von Dirk Hermann. Mit Beitr. von M. Arnold.* Stuttgart; New York, NY: Thieme: 2010. p. 229.
57. **Hersh EV, Lally ET, and Moore PA.** Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin* 21: 1217-1226, 2005.
58. **Hinz B, and Brune K.** Specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Basis and options of a pharmacotherapeutic concept. *Der Anaesthetist* 49: 964-971, 2000.
59. **Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, and Ross ME.** Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17: 9157-9164, 1997.
60. **IASP.** Classification of Chronic Pain. edited by Merkey H, and Bogduk N. Seattle: IASP Press, 1994.
61. **Jain KK.** *The Handbook of Neuroprotection.* Totowa, NJ: Springer Science+Business Media, LLC, 2011, p. 231.
62. **Jenkins WL.** Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: an overview. *J Am Vet Med Assoc* 191: 1231-1240, 1987.
63. **Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Shang X, Chen G, and Macdonald RL.** Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci* 10: 103, 2009.
64. **Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, and Arras M.** Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci* 4: 165, 2010.
65. **Jones SA.** Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175: 3463-3468, 2005.
66. **Jongen-Relo AL, and Feldon J.** Specific neuronal protein: a new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiol Behav* 76: 449-456, 2002.
67. **Juge O.** Physiopathology of brain edema. *Schweiz Med Wochenschr* 112: 956-959, 1982.
68. **Justiz Bd.** Tierschutzgesetz. Bundesministerium der Justiz, 1972, p. §9.
69. **Kamii H, Kato I, Kinouchi H, Chan PH, Epstein CJ, Akabane A, Okamoto H, and Yoshimoto T.** Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Stroke* 30: 867-871; discussion 872, 1999.
70. **Karow T, and Lang-Roth R.** Analgetika und Schmerztherapie. In: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, edited by Karow T. Pulheim: 2010, p. 607-609.
71. **Kehlet H.** Surgical stress: the role of pain and analgesia. *British journal of anaesthesia* 63: 189-195, 1989.
72. **Kelley BJ, Lifshitz J, and Povlishock JT.** Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 989-1001, 2007.
73. **Kelso ML, Scheff SW, Pauly JR, and Loftin CD.** Effects of genetic deficiency of cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2 on functional and histological outcomes following traumatic brain injury in mice. *BMC Neurosci* 10: 108, 2009.
74. **Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, and Clausen F.** Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 9: 17, 2012.
75. **Klatzo I.** Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol* 72: 236-239, 1987.

76. **Kompendium A.** Temgesic
<http://www.kompendium.ch/MonographieTxt.aspx?lang=de&MonType=fi>.
77. **Koziol PA.** Experimentelle Modelle zur Untersuchung der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung des Menschen, speziell des Vasospasmus - Systematische Übersichtsarbeit. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2011.
78. **Lahrman KH, and Ladewig J.** Cortisol determination before and after surgical treatments and associated methods in young pigs. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 106: 242-246, 1993.
79. **Langhoff R.** Untersuchungen über den Einsatz von Schmerzmitteln zur Reduktion kastrationsbedingter Schmerzen beim Saugferkel. In: *Klinik für Schweine*. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2008, p. ab S.31.
80. **Leach MC, Allweiler S, Richardson C, Roughan JV, Narbe R, and Flecknell PA.** Behavioural effects of ovariohysterectomy and oral administration of meloxicam in laboratory housed rabbits. *Res Vet Sci* 87: 336-347, 2009.
81. **Liebich H-G.** Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis; mit 11 Tabellen/ Hans-Georg Liebich. Unter Mitarb. von P. Böck. Wiss. Zeichn.: Barbara Ruppel. <http://d-nbinfo/993154786> 128, 2004.
82. **Lighthall JW.** Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of neurotrauma* 5: 1-15, 1988.
83. **Liles JH, and Flecknell PA.** The effects of buprenorphine, nalbuphine and butorphanol alone or following halothane anaesthesia on food and water consumption and locomotor movement in rats. *Lab Anim* 26: 180-189, 1992.
84. **Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, and Lee KS.** A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *J Neurosci Methods* 123: 89-97, 2003.
85. **Loane DJ, and Byrnes KR.** Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7: 366-377, 2010.
86. **Luh C.** Rolle des endothelialen kontraktiven Apparates bei der Entstehung eines Hirnrödems nach Schädelhirntrauma und Subarachnoidalblutung. In: *Klinik für Anästhesiologie*. Mainz: Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2011.
87. **Luippold G** editor. *Fallbuch Pharmakologie*. Tübingen: 2005, p. 13.
88. **Maas AI, Stocchetti N, and Bullock R.** Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7: 728-741, 2008, p. 13.
89. **Markgraf CG, Clifton GL, Aguirre M, Chaney SF, Knox-Du Bois C, Kennon K, and Verma N.** Injury severity and sensitivity to treatment after controlled cortical impact in rats. *Journal of neurotrauma* 18: 175-186, 2001.
90. **Masuhr KF, Neumann M.** Neurologie Duale Reihe. In: *Neurologie Duale Reihe*, edited by Masuhr KF, Neumann M. Thieme, 2007, p. 419.
91. **Mattle H.** *Kurzlehrbuch Neurologie 119 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2011, p. 353.
92. **Matz PG, Fujimura M, and Chan PH.** Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain. *Brain Res* 858: 312-319, 2000.
93. **Mayer K.** Subarachnoidalblutung (SAB)
http://www.neuro24.de/show_glossar.php?id=1642. 2011/08/06.
94. **Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, and Findlay JM.** In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery* 46: 448-460; discussion 460-441, 2000.
95. **Miehle W.** *Medikamentöse Therapie rheumatischer Erkrankungen 112 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2003, p. 33.

96. **Moller IW, Dinesen K, Sondergard S, Knigge U, and Kehlet H.** Effect of patient-controlled analgesia on plasma catecholamine, cortisol and glucose concentrations after cholecystectomy. *British journal of anaesthesia* 61: 160-164, 1988.
97. **Möllmann F.** Epidemiologie, Unfallursachen und akutklinische Initialversorgung beim Schädel-Hirn-Trauma, p. 4. Eine regional multizentrische prospektive Studie zur Versorgung Schädel-Hirn-traumatisierter Patienten in der Bundesrepublik Deutschland. 4, 2006.
98. **Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, and Kossmann T.** Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 16: 165-177, 2001.
99. **Mumenthaler M.** Kopf und Gesichtsschmerzen. In: *Neurologie 226 Tabellen*, edited by Mattle H. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2008, p. 703.
100. **Mumenthaler M.** Schädel-Hirn-Trauma. In: *Neurologie 226 Tabellen*, edited by Mattle H. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2008, p. 36.
101. **Mumenthaler M.** Zerebrale Durchblutungsstörungen und nichttraumatische intrakranielle Blutungen. In: *Neurologie 226 Tabellen*, edited by Mattle H. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2008, p. 177.
102. **Nickel R.** *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Bd. 2. Eingeweide.* Stuttgart: Parey, 2004, p. 142, 143.
103. **Ommaya AK, and Gennarelli TA.** Cerebral concussion and traumatic unconsciousness. Correlation of experimental and clinical observations of blunt head injuries. *Brain* 97: 633-654, 1974.
104. **Onyszchuk G, Al-Hafez B, He YY, Bilgen M, Berman NE, and Brooks WM.** A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology. *J Neurosci Methods* 160: 187-196, 2007.
105. **Petrov T, Underwood BD, Braun B, Alousi SS, and Rafols JA.** Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *Journal of neurotrauma* 18: 799-812, 2001.
106. **Pham TM, Hagman, B., Codita, A., Van Loo, P.L.P., Strämmer, L., Baumans V.** Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Elsevier - Physiology and Behavior* 663-668, 2010.
107. **Potts MB, Adwanikar H, and Noble-Haeusslein LJ.** Models of traumatic cerebellar injury. *Cerebellum* 8: 211-221, 2009.
108. **Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, and Svendgaard NA.** Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery* 52: 165-175; discussion 175-166, 2003.
109. **Randall DJ, Burggren W, French K, Eckert R, and Apfelbach R.** *Tierphysiologie: 55 Tabellen/ David Randall; Warren Burggren; Kathleen French. Roger Eckert. Übers. und bearb. von Raimund Apfelbach unter Mitarb. von Udo Gansloßer.* Stuttgart; New York: Thieme: 2002.
110. **Richardson CA, and Flecknell PA.** Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim* 33: 119-127, 2005.
111. **Rohkamm R.** *Taschenatlas Neurologie.* Stuttgart: Thieme, 2008.
112. **Rozen AW, Tsuma VT, and Magnusson U.** Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts. *Am J Vet Res* 56: 1225-1227, 1995.
113. **Rossaint W, Zwißler** editor. *Die Anästhesiologie.* Heidelberg: Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 2012, p. 248.

114. **Roughan JV, and Flecknell PA.** Buprenorphine: a reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating post-operative pain in animals. *Lab Anim* 36: 322-343, 2002.
115. **Ruchholtz SN-K, D.** *Der Chirurg 2.* Springer-Verlag, 2002, p. 194.
116. **Russel W, and Burch R** editors. *The Principles of Humane Experimental Technique.* 1959.
117. **Salomon F, Geyer H, and Gille U.** *Anatomie für die Tiermedizin.* Stuttgart: Enke, 2005.
118. **Sandhir R, Onyszchuk G, and Berman NE.** Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 213: 372-380, 2008.
119. **Sayama T, Suzuki S, and Fukui M.** Role of inducible nitric oxide synthase in the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurol Res* 21: 293-298, 1999.
120. **Schiele DM.** Untersuchungen über den Einsatz von topischer Kryobehandlung und Lokalanästhesie bei der Kastration männlicher Saugferkel. In: *Klinik für Schweine.* München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2010, p. 71.
121. **Schirmer M.** *Neurochirurgie.* Solingen: Thieme, 2005.
122. **Schumpelick V.** *Kurzlehrbuch Chirurgie 181 Tabellen.* Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2006.
123. **Schuttler J, Schmitz B, Bartsch AC, and Fischer M.** The efficiency of emergency therapy in patients with head-brain, multiple injury. Quality assurance in emergency medicine. *Der Anaesthetist* 44: 850-858, 1995.
124. **Schwab S, Kriger S, Müllges D, Hamman W, and Hacke G.** *Neurologische Intensivmedizin.* Berlin [u.a.]: Springer, 1999.
125. **Seule MA, Stienen MN, Cadosch D, Fournier JY, Lussmann R, Hildebrandt G, and Gautschi OP.** Aneurysmal subarachnoid hemorrhage - therapy and complications. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 45: 8-17, 2010.
126. **Shohami E, Novikov M, Bass R, Yamin A, and Gallily R.** Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 615-619, 1994.
127. **Silbernagl S, and Lang F.** *Taschenatlas Pathophysiologie/ Stefan Silbernagl ; Florian Lang. Ill. von Rüdiger Gay und Astrid Rothenburger.* Stuttgart; New York, NY: Thieme: 2009, p. 52.
128. **Sirimanne ES, Blumberg RM, Bossano D, Gunning M, Edwards AD, Gluckman PD, and Williams CE.** The effect of prolonged modification of cerebral temperature on outcome after hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Pediatr Res* 39: 591-597, 1996.
129. **Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, and McIntosh TK.** A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *Journal of neurotrauma* 12: 169-178, 1995.
130. **Smith WL, DeWitt DL, and Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145-182, 2000.
131. **Soares HD, Thomas M, Cloherty K, and McIntosh TK.** Development of prolonged focal cerebral edema and regional cation changes following experimental brain injury in the rat. *J Neurochem* 58: 1845-1852, 1992.
132. **Soblosky JS, Tabor SL, Matthews MA, Davidson JF, Chorney DA, and Carey ME.** Reference memory and allocentric spatial localization deficits after unilateral cortical brain injury in the rat. *Behav Brain Res* 80: 185-194, 1996.

133. **Stokes EL, Flecknell PA, and Richardson CA.** Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim* 43: 149-154, 2009.
134. **Stover JF, Schoning B, Beyer TF, Woiciechowsky C, and Unterberg AW.** Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci Lett* 288: 25-28, 2000.
135. **Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, Raghupathi R, Mehta S, and Narayan RK.** Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 17: 695-711, 2000.
136. **Sudakov SK, Goldberg SR, Borisova EV, Surkova LA, Turina IV, Rusakov D, and Elmer GI.** Differences in morphine reinforcement property in two inbred rat strains: associations with cortical receptors, behavioral activity, analgesia and the cataleptic effects of morphine. *Psychopharmacology (Berl)* 112: 183-188, 1993.
137. **Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, and Zavala F.** Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 42: 177-185, 1993.
138. **Thal SC, Heinemann M, Luh C, Pieter D, Werner C, and Engelhard K.** Pioglitazone reduces secondary brain damage after experimental brain trauma by PPAR-gamma-independent mechanisms. *J Neurotrauma* 28: 983-993, 2011.
139. **Thal SC, Mebmer K, Schmid-Elsaesser R, and Zausinger S.** Neurological impairment in rats after subarachnoid hemorrhage--a comparison of functional tests. *J Neurol Sci* 268: 150-159, 2008.
140. **Thal SC, Sporer S, Klopotoski M, Thal SE, Woitzik J, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, and Zausinger S.** Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 111: 988-994, 2009.
141. **Thal SC, Wyszkon S, Pieter D, Engelhard K, and Werner C.** Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *Journal of neurotrauma* 25: 785-794, 2008.
142. **Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Trembovler V, and Leker RR.** The Anti-Inflammatory Drug Carprofen Improves Long-Term Outcome and Induces Gliogenesis after Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* 2011.
143. **Thomale UWN.** Posttraumatische Veränderungen nach experimenteller kortikaler Kontusion und deren Bedeutung für Therapiestudien. In: *Neurochirurgie*. Berlin: Universitätsmedizin Berlin, 2006.
144. **Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, and Mier JW.** Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83: 113-118, 1994.
145. **Timaru-Kast R, Wyszkon S, Luh C, Schaible EV, Lehmann F, Merk P, Werner C, Engelhard K, and Thal SC.** Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma*. *Crit Care Med* 40: 935-944, 2012.
146. **Torok E, Klopotoski M, Trabold R, Thal SC, Plesnila N, and Scholler K.** Mild hypothermia (33 degrees C) reduces intracranial hypertension and improves functional outcome after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosurgery* 65: 352-359; discussion 359, 2009.
147. **Trabold R, Krieg S, Scholler K, and Plesnila N.** Role of vasopressin V(1a) and V2 receptors for the development of secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 25: 1459-1465, 2008.

148. **Trepel M.** *Neuroanatomie Struktur und Funktion; mit 27 Tabellen.* München [u.a.]: Urban & Fischer, 2004.
149. **Tubbs JT, Kissling GE, Travlos GS, Goulding DR, Clark JA, King-Herbert AP, and Blankenship-Paris TL.** Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 50: 185-191, 2011.
150. **Übel J.** Untersuchung zur Schmerzreduktion bei zootechnischen Eingriffen an Saugferkeln. In: *Tierärztliche Fakultät - Klinik für Schweine.* München: Ludwig Maximilians Universität 2011.
151. **Vakili A, Kataoka H, and Plesnila N.** Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1012-1019, 2005.
152. **Verster A, and Buning E.** Buprenorphin - wichtige Fragen unter der Lupe. Amsterdam, Niederlande: 2005.
153. **Veterinärpharmakologie.** Carprofen-Pharmakologie <http://www-vetpharm.uzh.ch/wir/00005371/6497F.htm>. 2011/08/06.
154. **Veterinärpharmakologie.** Meloxicam-Pharmakologie Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie. http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00007112/5387_F.htm. 2012].
155. **Wallesch C-W.** *Neurotraumatologie.* [s.l.]: THIEME, 2005.
156. **Werner C, and Engelhard K.** Pathophysiology of traumatic brain injury. *British journal of anaesthesia* 99: 4-9, 2007.
157. **Widenka DC, Medele RJ, Stummer W, Bise K, and Steiger HJ.** Inducible nitric oxide synthase: a possible key factor in the pathogenesis of chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 90: 1098-1104, 1999.
158. **Wright-Williams SL, Courade JP, Richardson CA, Roughan JV, and Flecknell PA.** Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 130: 108-118, 2007.
159. **Wu X, Wang BJ, and Zhang GH.** The dynamically changes of COX-2 and the gene expression of COX-2 mRNA after traumatic brain injury in rats. *Fa Yi Xue Za Zhi* 20: 4-6, 8, 2004.
160. **Yu S, Zhang X, Sun Y, Peng Y, Johnson J, Mandrell T, Shukla AJ, and Laizure SC.** Pharmacokinetics of buprenorphine after intravenous administration in the mouse. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 45: 12-16, 2006.
161. **Zernikow B.** *Schmerztherapie bei Kindern.* Heidelberg: Springer, 2005, p. 5.
162. **Zhang B, Fugleholm K, Day LB, Ye S, Weller RO, and Day IN.** Molecular pathogenesis of subarachnoid haemorrhage. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1341-1360, 2003.
163. **Zöls S.** Möglichkeiten der Schmerzreduktion bei der Kastration männlicher Saugferkel. In: *LMU München, Schweineklinik.* München: LMU, 2006.
164. **Zupan Z, Pilipovic K, Dangubic B, Frkovic V, Sustic A, and Zupan G.** Effects of enoxaparin in the rat hippocampus following traumatic brain injury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 1846-1856, 2011.
165. **Zweckberger K, Eros C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, and Plesnila N.** Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *Journal of neurotrauma* 23: 1083-1093, 2006.

13 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Christian Werner, dem Klinikleiter der Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz, der mir die Möglichkeit gegeben hat die für meine Dissertation notwendigen Studien in seinem Institut durchzuführen. Ein weiterer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Kristin Engelhard, leitende Oberärztin der Anästhesiologie, die mir als habilitierte Betreuerin an der Universitätsmedizin Mainz jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank geht an meine Doktormutter Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka, die die Betreuung meiner Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät übernommen hat.

Großer Dank gilt Herrn Dr. med. Serge Thal, meinem Betreuer. Wegen seines großen Engagements und seiner unermüdlichen Geduld wurde für jedes entstehende Problem eine Lösung gefunden. Als Ansprechpartner, der jederzeit verfügbar war, hat er den größten Anteil am Gelingen dieses Dissertationsprojektes.

Einen weiteren Dank möchte ich Frau Dr. med. Eva-Verena Schaible aussprechen, die mir in Studienplanung und Durchführung mit vielen Tipps zur Seite stand.

Mein besonderer Dank geht an Frau Frida Kornes und Frau Dana Pieter. Mithilfe ihres Fachwissens, ihrer organisatorischen Fähigkeiten und ihrer Äußerungen konstruktiver Kritik haben sie mich bedeutend unterstützt in der Durchführung der Versuche und der Niederschrift der Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen tatkräftigen Mitarbeitern, Mitarbeiterinnen und Doktoranden des Labors – Herr Tobias Hirnet, Frau Dr. med. Anne Sebastiani, Frau Kirsten Simon und Herrn Arne Steinsträsser, ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich Frau Jutta Faber sehr für das Korrekturlesen meiner Dissertation und Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für die Überprüfung der Statistik.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die mich immer unterstützt und mir mein Tiermedizinstudium und meine Promotion ermöglicht haben. Danke, dass Ihr immer an mich glaubt. Der letzte Dank geht an meinen Freund Alexander Nagel. Neben Deinem unermüdlichen Einsatz zur Korrektur dieser Dissertation - unzählige Male - Seite um Seite, danke ich Dir auch für Deine unendliche Liebe und dafür, dass Du mich immer aufbaust, wenn es einmal wieder nicht so klappt wie geplant.